

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Anna Horbaczewska

**Analiza czynników wpływających na powodzenie implantacji w  
endometrium kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej  
etiologii.**

*Rozprawa doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Robert Jach

Pracę wykonano w Klinice Endokrynologii Ginekologicznej UJ CM

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Robert Jach

Kraków, 2020 r.

*Składam serdeczne podziękowania*

*Promotorowi*

***Panu Prof. dr hab. n. med. Robertowi Jachowi***

*za nieustanne wsparcie – zarówno merytoryczne jak i logistyczne, cenne wskazówki oraz  
zaufanie okazane w trakcie tworzenia pracy.*

*Pragnę także podziękować*

***Rodzinie, Koleżankom i Kolegom z Kliniki Endokrynologii Ginekologicznej CMUJ***

*za motywację i wsparcie podczas prowadzonych prac.*

## Spis treści:

Wykaz stosowanych skrótów.....	5
1. Wstęp.....	8
1.1. Niepłodność jako problem zdrowotny i społeczny.....	8
1.2. Czynniki wpływające na płodność.....	9
1.3. Przebieg procesu zapłodnienia.....	11
1.4. Przebieg procesu implantacji.....	13
1.4.1. Receptywność endometrium.....	14
1.4.2. Rola szczególnych molekuł zapalnych.....	16
1.4.2.1. Stan zapalny a płodność.....	16
1.4.2.2. Interleukina 18.....	19
1.4.2.3. Histamina.....	21
1.4.3. Rola transporterów glukozy.....	23
1.5. Endometrial scratching.....	25
2. Cel pracy.....	27
3. Materiał i metodyka.....	28
3.1. Charakterystyka materiału klinicznego.....	28
3.2. Metodyka badań immunohistochemicznych i histopatologicznych.....	29
3.2.1. Oznaczanie IL-18, histaminy i GLUT4 w endometrium.....	29
3.2.2. Oznaczanie IL-18 i histaminy we krwi.....	31
3.3. Metodyka analizy statystycznej.....	32
4. Wyniki.....	32
4.1. Analiza ogólna.....	32
4.2. Ocena poziomu IL-18 w endometrium.....	33
4.3. Ocena poziomu IL-18 we krwi.....	34
4.4. Ocena poziomu histaminy w endometrium.....	36
4.5. Ocena poziomu histaminy we krwi.....	37
4.6. Analiza korelacji poziomów IL18 i histaminy w endometrium z poziomem we krwi.....	38
4.7. Ocena poziomu GLUT4 w endometrium.....	38
5. Dyskusja.....	40
6. Wnioski.....	51
7. Streszczenie w języku polskim.....	52

8. Summary in english.....	56
9. Piśmiennictwo.....	60
10. Spis tabel.....	72
11. Spis rycin.....	72

Wykaz stosowanych skrótów.

AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP (*AMP-activated protein kinase*)

APC – komórki prezentujące antygen (*antigen presenting cells*)

ART – techniki rozrodu wspomaganego (*assisted reproductive technologies*)

AZF – (*azoospermia factor*)

BMP – białko morfogenetyczne kości (*bone morphogenetic protein*)

CAT – aktywność katalazy (*catalase activity*)

COX-2 – cyklooksygenaza typu 2 (*cyclooxygenase-2*)

DAO – oksydaza diaminowa (*diamin oxidase*)

EDC – związki chemiczne zaburzające funkcję układu hormonalnego (*endocrine disrupting compounds*)

EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*)

EHRF – zarodkowy czynnik uwalniający histaminę (*embryonic histamine-releasing factor*)

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embrology

FSH – hormon folikulotropowy (*follicle-stimulating hormone*)

GLUT – transporter glukozy (*glucose transporter*)

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GnRH – hormon uwalniający gonadotropinę (*gonadotropin-releasing hormone*)

GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (*G-protein coupled receptor*)

hCG – ludzka gonadotropina kosmówkowa (*human chorionic gonadotropin*)

HEFA – Human Fertilisation and Embryology Authority

HRF – czynnik uwalniający histaminę (*histamine-releasing factor*)

HRF – czynnik zwiększający wydzielanie histaminy (*histamine-releasing factor*)

IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor*)

IL – interleukina (*interleukin*)

IL-18BP – białko wiążące IL-18 (*IL-18 binding protein*)

IL-18R – receptor wiążący IL-18 (*IL-18 receptor*)

iNOS – indukowana syntaza tlenku azotu (*induced nitric oxide synthase*)

IVF – zapłodnienie pozaustrojowe (*in vitro fertilisation*)

LH – hormone luteinizujący (*luteinizing hormone*)

LIF – czynnik hamujący białaczkę (*leukemia inhibitory factor*)

LPO – peroksydaza lipidowa (*lipid peroxidase*)

MeHi – metylohistamina (*methylhistamine*)

MeImAA – kwasu metyloimidazooctowy (*methylimidazoleacetic acid*)

MMP – metaloproteinaza (*matrix metalloproteinase*)

NF-kappa B – czynnik jądrowy kappa B (*nuclear factor kappa B*)

NK – komórki naturalnych zabójców (*natural killers*)

OS – stres oksydacyjny (*oxidative stress*)

PAF – czynnik aktywujący płytki krwi (*platelet activating factor*)

PCOS – zespół policystycznych jajników (*polycystic ovary syndrome*)

PIBF – czynnik blokujący indukowany progesteronem (*progesterone-induced blocking factor*)

POI – przedwczesna niewydolność jajników (*premature ovarian insufficiency*)

RCOG – Royal College of Obstetricians and Gynaecologists

RCT – badanie kliniczne z randomizacją (*randomized controlled trial*)

RIF – nawracające niepowodzenia implantacji (*repeated implantation failure*)

ROS – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*)

SGLT – transporter glukozy sprzężony z sodem (*sodium-glucose linked transporter*)

SOD – dysmutaza nadadtlenkowa (*superoxide dismutase*),

TAP – całkowita moc przeciwutleniająca (*total antioxidant power*)

TGF – transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*)

Treg – regulacyjne limfocyty T (*regulatory T-cells*)

TTG – całkowite grupy tiolowe (*total thiol group*)

uNK – maciczne komórki NK (*uterine NK*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłoka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organisation*)

## 1. Wstęp.

### 1.1. Niepłodność jako problem zdrowotny i społeczny.

Niepłodność definiowana jest przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organisation*, WHO) jako niemożność zajścia w ciążę przez 12 miesięcy pomimo regularnego współżycia płciowego (3-4 razy w tygodniu), bez zastosowania jakichkolwiek środków zabezpieczających. Szacuje się, że problem ten dotyka około 8 do 12% par w wieku reprodukcyjnym na całym świecie, co odpowiada ponad 186 milionom ludzi. Jest to szczególnie widoczne w krajach rozwiniętych (1). W Polsce niepłodność dotyka około 1-1,5 miliona par (2).

U około 80% par dochodzi do zapłodnienia w ciągu pierwszych sześciu miesięcy starań o ciążę. Spośród pozostałych, około 50% zajdzie w ciążę w ciągu kolejnych sześciu miesięcy. Po 48 miesiącach starań około 5% par pozostanie bezdzietnych (3).

Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii z 2018r. okres bezskutecznych starań o ciążę, po którym para powinna skorzystać ze specjalistycznej konsultacji, zależy od wieku kobiety, przebiegu jej cykli, przebytych operacji w obrębie miednicy, wielkości rezerwy jajnikowej oraz planów prokreacyjnych partnerów. U pacjentek młodych (poniżej 35. roku życia) bez obciążeń w wywiadzie, rozpoczęcie diagnostyki w kierunku niepłodności wskazane jest po roku regularnego współżycia, u kobiet po 35. roku życia – po 6. miesiącach, zaś u pacjentek po 40. roku życia – nawet bezpośrednio po zadeklarowaniu planów prokreacyjnych. Wszelkie nieprawidłowości w badaniu podmiotowym lub przedmiotowym kobiety lub mężczyzny, niezależnie od wieku pacjentów, usprawiedliwiają wcześniejsze rozpoczęcie diagnostyki niepłodności (2).

Niektórzy autorzy postulują wyodrębnienie trzystopniowej skali oceniającej płodność, wyróżniając pojęcie ograniczonej płodności (*subfertility*). W zamyśle miałoby to wyeliminować problem zarówno przeddiagnozowania jak i niedodiagnozowania par starających się o potomstwo (3).

Niepłodność jest poważnym problemem z perspektywy psychologicznej i społecznej. Wiąże się z obniżeniem poczucia własnej wartości, zwiększonym poziomem stresu oraz obniżonym nastrojem. Wpływa na poczucie bezpieczeństwa partnerów, ocenę własnej atrakcyjności seksualnej oraz poziom wzajemnego zaufania (4). Stanowi również istotny



czynnik wpływający na stan demograficzny i wskaźniki makroekonomiczne kraju, pośrednio więc i na dobrobyt całego społeczeństwa (2).

## 1.2. Czynniki wpływające na płodność.

Niepłodność jest stanem dotykającym zawsze parę. Czynniki męski w wyłączności odpowiada za 20-30% przypadków niepłodności, niemniej współodpowiada za ok. 50% przypadków. Wśród kobiet na świecie najczęstszą formą niepłodności jest niepłodność wtórna, często spowodowana przez zakażenia układu rozrodczego. Trzy najistotniejsze czynniki mające wpływ na szansę na zajście w ciążę to czas starań o ciążę, wiek kobiety oraz choroby wpływające na płodność. Szanse za spontaniczne zajście w ciążę maleją wraz z wydłużaniem okresu starań o ciążę i to ten czas określa zaawansowanie problemu. Potencjał reprodukcyjny maleje u kobiet wraz z wiekiem już od 25.-30. roku życia w związku ze stopniowym zmniejszaniem się puli oocytów w obu jajnikach. Spadek ten wynosi średnio 4,5% u kobiety 25-letniej, 12% u 35-letniej, 50% u 41-letniej, a 90% u kobiety w wieku 45 lat. Oprócz ilości oocytów obniża się także ich jakość. Coraz wyższy wiek kobiet w momencie koncepcji jest najistotniejszym negatywnym czynnikiem predykcyjnym dla płodności (1,3).

Część chorób wpływających na płodność może dotyczyć obu płci. Hipogonadyzm hipogonadotropowy prowadzi do niedostatecznej stymulacji gonad przez hormon luteinizujący (*luteinizing hormone*, LH) oraz hormon folikulotropowy (*follicle-stimulating hormone*, FSH), co wynika z niedoboru hormonu uwalniającego gonadotropinę (*gonadotropin-releasing hormone*, GnRH). Hiperprolaktynemia odpowiada za hamowanie wydzielania gonadotropin, prowadząc do anowulacji u kobiet oraz obniżenia poziomu testosteronu i dysfunkcji seksualnych u mężczyzn. Mukowiscydoza, choroba spowodowana mutacją genu *CFTR*, charakteryzuje się nieprawidłowym wydzielaniem śluzu. U kobiet gęsta wydzielina szyjki macicy utrudnia penetrację plemników. Mężczyźni obciążeni tą mutacją często cierpią na wrodzony brak lub niedorozwój nasieniowodów. Nieprawidłowa praca aparatu rzęskowego może być skutkiem infekcji (u kobiet) lub wrodzonej pierwotnej dyskinezy rzęsek (u obu płci). Prowadzi do upośledzenia transportu komórki jajowej przez jajowód, zwiększając tym samym ryzyko wystąpienia ciąży pozamaciczej, bądź upośledza ruchliwość plemników z uwagi na nieprawidłowości w budowie wtyki plemnika. W różny sposób na płodność wpływają czynniki infekcyjne. U mężczyzn mogą one łączyć się z plemnikami lub prowadzić do uszkodzeń na poziomie komórkowym na skutek działania

mediatorów stanu zapalnego. U kobiet wywołują stany zapalne miednicy mniejszej oraz mogą ograniczać drożność jajowodów. Najczęstszym patogenem infekcyjnym prowadzącym do niepłodności jest *Chlamydia trachomatis*. Duże znaczenie dla powodzenia starań o ciążę ma ogólny stan zdrowia. Źle kontrolowana cukrzyca, celiakia, niedobór witaminy D, okresy zaostrzeń chorób układowych czy subkliniczna niedoczynność tarczycy mogą wydłużać czas starań o ciążę. Udowodniono wpływ szeregu modyfikowalnych czynników na płodność u obu płci. Jednym z najistotniejszych jest dieta. Zarówno restrykcje dietetyczne, zwłaszcza w połączeniu z intensywną aktywnością fizyczną, jak i otyłość mogą w niekorzystny sposób wpływać na pracę układu hormonalnego mężczyzn i kobiet. Inne czynniki wydłużające czas starań o ciążę to ekspozycja na stres, palenie papierosów oraz marihuany (1).

W niepłodności kobiecej najczęstszą przyczyną jest przedwczesna niewydolność jajników (*premature ovarian insufficiency*, POI), która dotyka około 1% kobiet. Definiuje się ją jako ustanie miesiączkowania przed 40. rokiem życia, któremu towarzyszy wzrost poziomu FSH stwierdzony dwukrotnie w odstępie co najmniej miesiąca. Przyczyny POI mogą być genetyczne, środowiskowe, infekcyjne (np. po przebytych zakażeniach wirusem świnki), związane z chorobami autoimmunologicznymi czy będące następstwem terapii przeciwnowotworowej lub operacji. Kolejną przyczyną niepłodności kobiecej jest zespół policystycznych jajników. Jest to heterogeniczny zespół objawów o różnych fenotypach. Zgodnie z kryteriami rotterdamскими składają się nań: zaburzenia owulacji, kliniczne lub biochemiczne cechy hiperandrogenizmu oraz obraz jajników w badaniu ultrasonograficznym. Coraz bardziej powszechnym schorzeniem staje się endometrioza, czyli obecność komórek endometrium poza jamą macicy. Jej wpływ na płodność wynika z obecności przewlekłego stanu zapalnego w obrębie miednicy mniejszej, zmian anatomicznych na skutek powstawania zrostów oraz zaburzeń immunologicznych. Znaczenie dla płodności mogą mieć także struktury patologiczne w obrębie mięśnia lub jamy macicy. Mięśniaki macicy o lokalizacji modelującej jamę macicy oraz polipy endometrialne mogą obniżać wskaźnik implantacji (5).

W niepłodności męskiej największą rolę odgrywają dysfunkcje jąder. Może być ona wrodzona: anorchia, dysgeneza gonad, wnetrostwo, mutacje genetyczne – zespół Klinefeltera, mikrodelecje w regionie AZF (*azoospermia factor*); nabyta: pourazowa, jatrogenna, na skutek żyłaków powrózka nasiennego lub chorób układowych; bądź idiopatyczna. Inne przyczyny to zaburzenia ejakulacji np. na skutek zamknięcia drogi wypływu nasienia (wrodzone, pozapalne) czy genetycznie uwarunkowany brak

nasieniowodów. Według WHO wraz z upływem lat obserwowany jest spadek jakości nasienia w populacji. Znalazło to wyraz w obniżeniu wartości referencyjnych badania nasienia opublikowanych w 2010r. w porównaniu z wartościami z 1999r.

Związki chemiczne zaburzające funkcję układu hormonalnego (*endocrine disrupting compounds*, EDC) mogą także upośledzać płodność. Badania na zwierzętach wykazały szczególnie niekorzystny wpływ bisfenolu A, ftalanów oraz ich estrów, pestycydu atrazyny oraz insektycydu DDT/DDE w mechanizmie obniżenia ilości oocytów, zaburzeń owulacji, mejozy, implantacji, obniżenia parametrów nasienia, występowania zaburzeń anatomicznych czy zwiększenia częstości raka jądra. Niekorzystnie na płodność wpływa także bliskie pokrewieństwo rodziców (1).

U około 20-30% par nie udaje się ustalić czynnika powodującego niepłodność po zastosowaniu rutynowych badań diagnostycznych. Narzędzia jakimi dysponujemy wciąż są bowiem niedoskonałe oraz nacechowane ograniczeniami. Wśród potencjalnych przyczyn niepłodności nieokreślonej wymienia się w szczególności: nieprawidłowości genetyczne komórek rozrodczych i zarodków, nieprawidłowości funkcjonalne komórek rozrodczych i zarodków, zaburzenia genetyczne partnerów niepodlegające detekcji na obecnym poziomie dostępnej rutynowo diagnostyki genetycznej, problemy z zapłodnieniem na poziomie komórkowym, zaburzenia funkcji oraz dyskretne anomalie anatomiczne jajowodów (pomimo zachowanej drożności) zaburzające transport komórek rozrodczych oraz zarodków, zaburzenia implantacji oraz nieprawidłowości immunologiczne. Niestety diagnostyka powyższych nieprawidłowości albo jest kosztowna, albo ma charakter eksperymentalny i nie może być rekomendowana pacjentom w rutynowym postępowaniu w ośrodkach wspomaganej prokreacji, stanowi ona natomiast przedmiot badań naukowych. Rozpoznanie niepłodności nieokreślonej według niektórych ekspertów nie może być postawione bez przeprowadzenia diagnostyki, której zakres trudno określić ze względu na subiektywne poglądy i doświadczenia własne lekarzy (2).

### 1.3. Przebieg procesu zapłodnienia.

Zapłodnienie to złożony proces składający się z sekwencji wydarzeń, w wyniku którego następuje fuzja oocyta i plemnika a w efekcie stworzenie jednej diploidalnej komórki - zygoty. Z niej rozwinię się nowy, niezależny organizm.

Do zapłodnienia dochodzi w bańce jajowodu. Trafia tam uwolniony w trakcie owulacji kompleks oocyta, składający się z trzech elementów: komórki jajowej zatrzymanej w

metafazie drugiego podziału mejotycznego, macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wzgórka jajonośnego. Przedostanie się plemnika do jajowodu przez krypty szyjki oraz jamę macicy jest mediowane przez hormony jajnika. Estrogeny wpływają na strukturę, skład i aktywność nabłonka gruczołowego macicy oraz jajowodu. Plemnik składa się z główki zawierającej materiał DNA oraz enzymy umożliwiające penetrację oocyty, wstawki zawierającej elementy komórkowe, centriole, mikrotubule i mitochondria odpowiadające za wytwarzanie energii oraz wici, odpowiedzialnej za ruchliwość plemnika. Plemnik odnajduje drogę do komórki jajowej dzięki chemotaksji (6). Oocyt wydziela 14-aminkowasowy peptyd resact, rozpoznawany przez cyklazę guanylową obecną w błonie komórkowej plemnika. Po ich połączeniu dochodzi do stymulacji czynności ruchowej wici plemnika (7).

Pierwszy etap zapłodnienia to przygotowanie plemnika. Składa się z dwóch etapów: kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Dochodzi do nich w drogach rodnych kobiety. Procesy te związane są ze zmianami w metabolizmie, budowie błony komórkowej, fosforylacji białek, pH oraz wewnątrzkomórkowym stężeniu wapnia. Obejmują sprzężenie ścieżek przekazywania sygnałów regulujących inicjalizację reakcji akrosomalnej, zmiany w ruchliwości wici konieczne do spenetrowania osłonki przejrzystej (*zona pellucida*) oocyty czy nabycie zdolności do fuzji z oocytem (8).

Drugi etap zapłodnienia to połączenie plemnika z komórką jajową, następujące bezpośrednio po reakcji akrosomalnej wywołanej połączeniem plemnika z osłoną przejrzystą. Następuje wówczas fuzja błon komórkowych obu gamet (6). W plemniku jedynym białkiem o udowodnionym kluczowym znaczeniu dla procesu fuzji gamet jest Izuomo1 (nazwane na cześć japońskiej świątyni szczęścia małżeńskiego). Plemniki pozbawione tego białka kumulują się wokół oocyty po penetracji osłonki przejrzystej, nie mogąc dostać się w głąb. Izuomo1 łączy się z receptorem IZUOMO1R (zwanym także Juno, na cześć rzymskiej bogini płodności i małżeństwa) na powierzchni oocyty (9,10).

Trzeci etap zapłodnienia to reakcja korowa. Jest to swego rodzaju blok przed polispermia, polegający na zmianie właściwości błony oocyty tak, aby nie mogło dojść do zapłodnienia przez kolejne plemniki. Po tym następuje wznowienie procesu mejozy oraz aktywacja zygoty (11).

Niepowodzenia w procesie zapłodnienia mogą wynikać z błędów na poziomie molekularnym związanym z ekspresją receptorów na powierzchni błony oocyty, nieprawidłowego połączenia gamet, nieprawidłowego stężenia jonów wapnia, błędów w drugim podziale mejotycznym oocyty, nieprawidłowej kondensacji lub remodelingu

chromatyny w plemniku bądź wadliwego funkcjonowania wrzeciona podziałowego w trakcie mitozy (6).

#### 1.4. Przebieg procesu implantacji.

Po zapłodnieniu zygota rozpoczyna proces podziałów komórkowych przemieszczając się z jajowodu do jamy macicy, gdzie osiągając stadium blastocysty zagnieżdża się (implantuje) w błonie śluzowej jamy macicy (endometrium). Fizjologiczne i molekularne procesy rządzące tym procesem są złożone, lecz bardzo uporządkowane. Obejmują szereg interakcji fizycznych i fizjologicznych między trofoektodermą blastocysty i różnymi typami komórek endometrium, w tym nabłonkowymi i zrębowymi. Implantacja obejmuje trzy etapy: przyłożenie, przywiązanie i penetrację. Błędy pojawiające się na tym etapie mogą nie tylko całkowicie uniemożliwić zagnieżdżenie blastocysty, ale także wpływać na dalszy przebieg ciąży manifestując się takimi powikłaniami jak zaburzenia podziałów komórkowych zarodka, nieprawidłowa placentacja, wewnątrzmaciczne zaburzenia wzrastania płodu, poronienie czy poród przedwczesny (12). W naturalnym cyklu szanse na uzyskanie ciąży wynoszą ok. 30%, a tylko 50-60% ciąż osiągnie zaawansowanie 20. tygodnia. Za 75% utraconych ciąż odpowiadają niepowodzenia implantacji. Pomimo znaczącego rozwoju procedur zapłodnienia pozaustrojowego (*in vitro fertilisation*, IVF) i technologii transferu zarodka, dzięki którym możliwe było pokonanie wielu przyczyn niepłodności, ogólny wskaźnik uzyskanych dzięki tej metodzie ciąż pozostaje relatywnie niski, na poziomie około 30% na cykl, właśnie z uwagi na niepowodzenia implantacji (13).

Do zagnieżdżenia może dojść w ściśle określonym momencie cyklu miesięczkowego, kiedy zdolność blastocysty do zagnieżdżenia nakłada się z gotowością do jej przyjęcia przez endometrium, tzw. receptywnością endometrium. Przedział czasowy w którym endometrium wykazuje tę właściwość zwany jest oknem implantacyjnym. Rozminięcie się w czasie tych dwóch faz skutkuje poronieniem. Nabywanie receptywności przez błonę śluzową macicy jest odzwierciedlone w zmianach komórkowych i ultrastrukturalnych. Komórki nabłonka tracą stopniowo polaryzację i formują mikroprotruzje zwane pinopodiami (12). Procesy są sterowane hormonalnie, przez estrogeny i progesteron pochodzenia jajnikowego. Ponadto znaczenie odgrywają lokalnie produkowane molekuły sygnalizacyjne, takie jak cytokiny, czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne homeoboxu, mediatory lipidowe oddziałujące za pomocą sygnalizacji autokrynnej, parakrynnej i juxtakrynnej. W odpowiedzi na zagnieżdżenie się zarodka, otaczający zrąb macicy

przechodzi transformację molekularną zwaną decydualizacją, aby umożliwić wzrost zarodka i jego dalszą penetrację.

Z uwagi na ograniczenia natury eksperymentalnej oraz etycznej, zrozumienie przebiegu implantacji u człowieka oparte jest głównie na modelach zwierzęcych. Kluczowe jest zrozumienie hierarchicznych ścieżek zarządzających całym procesem, co pomoże zapobiec niepowodzeniom implantacji i zwiększyć odsetek uzyskiwanych ciąż.

#### 1.4.1. Receptywność endometrium.

U ssaków łożyskowych, endometrium staje się receptywne dla zaimplantowania blastocysty w czasie trwania okna implantacyjnego. U ludzi jest to okres trwający od 3 do 6 dni, przypadający na połowę fazy wydzielniczej. W cyklu miesięczkowym o długości 28 dni szacunkowo trwa od 20. do 24. dnia cyklu – to jest od 6 do 10 dni po pikie LH (14). Kluczem dla receptywności endometrium są dynamiczne i precyzyjnie kontrolowane molekularne i komórkowe procesy napędzające wzrost blastocysty, wpływające na jej przyleganie do endometrium oraz kolejne przemiany.

Poziom estrogenów determinuje długość okna implantacyjnego – niski poziom estrogenów wydłuża okno implantacyjne, podczas gdy wzrost poziomu zamyka okno wprowadzając endometrium w stadium refrakcji. Wysokie poziomy estrogenów w endometrium u ludzi, na przykład po stymulacji owulacji za pomocą cytrynianu klomifenu, mogą skutkować niepowodzeniem implantacji. Jak udowodniono, wysoka ekspresja aromatazy (hormonu odpowiedzialnego za konwersję androgenów w estrogeny) w komórkach endometrium, jest związana z gorszymi wynikami procedury zapłodnienia pozaustrojowego. Z kolei stosowanie inhibitorów aromatazy lub FSH w przebiegu stymulacji owulacji, co obniża poziom estrogenów, poprawia receptywność endometrium i zwiększa odsetek uzyskanych ciąż (15). Progesteron produkowany przez ciało żółte odpowiada za przygotowanie endometrium do implantacji, jak również modyfikację odpowiedzi immunologicznej matki zapobiegającej odrzuceniu allogenicznego płodu. Powoduje on bezpośrednie hamowanie proporcjonalnej odpowiedzi komórkowej typu Th1 poprzez pobudzenie syntezy czynnika blokującego indukowanego progesteronem (*progesterone-induced blocking factor*, PIBF) we krwi krążącej i na poziomie trofoblastu, a także na drodze blokowania aktywności i proliferacji cytotoksycznych komórek T i komórek naturalnych zabójców (*natural killers* – NK) (16).

Ciąża jest powiązana z dominującym profilem cytokin o działaniu przeciwzapalnym. Jednak wachlarz cytokin obserwowany w układzie płodowo-matczym jest trudny do zaklasyfikowania w paradygmacie czysto prozapalnym i przeciwzapalnym, a dodatkowo utrudnia to obserwacja, że pewne cytokiny prozapalne są niezbędne w procesie udanej implantacji (17). Ciąża została opisana jako „zjawisko Th-2 zależne” a zatem związana jest z wydzielaniem cytokin wyzwalających odporność humoralną (np. IL-10 i IL-6). Niepowodzenie ciąży może być powiązane z miejscową produkcją cytokin Th-1 zależnych (np. IFN-gamma i TNF-beta), o których wiadomo, że wyzwalają odporność komórkową (18). Techniki immunocytochemiczne wykazały sekwencyjną czasową ekspresję szeregu mediatorów implantacji w tkance endometrium, takich jak integryna B3 i glikodelina, które pojawiają się podczas domniemanego okna implantacyjnego (14,17).

Cytokiny o największym znaczeniu dla receptywności endometrium należą do rodziny interleukiny 6 (IL-6). Są to przede wszystkim czynnik hamujący białaczkę (*leukemia inhibitory factor*, LIF), IL-6 oraz IL-11. Oddziałują one poprzez glikoproteinę 130 (gp130), podstawową jednostkę receptorów dla cytokin. Ekspresja kluczowej cytokiny, LIF, następuje dwufazowo, najpierw w gruczołach macicy, a następnie w komórkach zrębu otaczających blastocystę podczas procesu przylegania. Niedobór LIF lub farmakologiczna blokada jego działania prowadzi do niepowodzeń implantacji. Duże znaczenie przypisuje się także IL-6, wydzielanej przez komórki epitelium i zrębu macicy cyklicznie, pod wpływem hormonów steroidowych. Jej poziom wzrasta w fazie lutealnej. Obniżenie IL-6 wiąże się z występowaniem poronień, jednak podniesiony poziom tej cytokiny był obserwowany u kobiet ze stwierdzonym stanem przedrzucawkowym czy porodem przedwczesnym.

Genetycznie receptywność oraz proces decydualizacji są sterowane przez geny homeoboxu *Hoxa10* i *Hoxa11*, których ekspresja wzrasta w efekcie działania hormonów steroidowych, a jest znamienne niższa u kobiet nieplodnych (13).

Dialog między blastocystą i macicą to nic innego jak wzajemna interakcja nabłonka i mezenchymy, mediowana przez szlaki sygnałowe, w których pośredniczą białka Indian hedgehog (IHH), białka morfogenetyczne kości (*bone morphogenetic protein*, BMP), Wnts i ich pokrewne receptory. IHH dostosowuje proliferację, różnicowanie i komunikację między komórkami w wielu procesach w organizmie, takich jak organogeneza, różnicowanie komórek macierzystych i onkogeneza. Zależna od progesteronu ekspresja IHH jest ograniczona do nabłonka, podczas gdy efektory IHH, patched-1 i czynniki transkrypcyjne rodziny GLI-Krüppel1–3 ulegają ekspresji w zrębie leżącym poniżej.

Usunięcie IHH z macicy powoduje niepowodzenie implantacji z powodu braku proliferacji zrębu mediowanej progesteronem, angiogenezy i decydualizacji. Analiza mikromacierzy pokazuje, że mRNA IHH jest zsynchronizowane z wydzielaniem progesteronu podczas cyklu miesięczkowego. Co więcej, ekspresja IHH w endometrium jest zmniejszona u kobiet z endometriozą, co wynika z oporności na progesteron. BMP to największa rodzina morfogenów należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu beta (*transforming growth factor beta*, TGF-beta). BMP2 ulega ekspresji w macicy w odpowiedzi na progesteron, z intensywną ekspresją w komórkach zrębu otaczających wszczepiony zarodek. Badania *in vitro* wykazały, że dodanie rekombinowanego BMP2 do niezróżnicowanych komórek zrębu znacznie przyspiesza decydualizację poprzez stymulowanie szlaku sygnałowego Smad, podczas gdy wyciszenie ekspresji BMP2 w tych komórkach skutecznie blokuje decydualizację. Eksperymenty z profilowaniem ekspresji genów zidentyfikowały Wnt4 jako dalszy cel decydualizacji indukowanej BMP2. Ulega on ekspresji w nabłonku gruczołowym w okresie przed implantacją, a następnie ponownie lokalizuje się w komórkach zrębu otaczających zaimplantowany zarodek, rozszerzając swoją ekspresję na doczesną. Warunkowe usunięcie Wnt4 w macicy powoduje, że samice myszy są nieplodne z powodu nieprawidłowej implantacji zarodka i decydualizacji. Oprócz Wnt4 wiele innych elementów szlaku sygnałowego Wnt (Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Sfrp4 – białko hamujące Wnt) jest regulowanych przestrzennie w macicy w okresie perinatalnym i uważa się, że mają one kluczowe znaczenie dla implantacji. Odmienna ekspresja Wnts i ich cząsteczek hamujących podkreśla, że precyzyjnie regulowany system Wnt jest istotny dla przygotowania macicy do implantacji (13).

#### 1.4.2. Rola szczególnych molekuł prozapalnych.

##### 1.4.2.1. Stan zapalny a płodność.

Rozpoznanie stanu zapalnego sięga starożytności. Jak udokumentował Celsus w I wieku naszej ery, starożytni zaobserwowali, że reakcja tkanek na uszkodzenie spowodowała powstanie zaczerwienienia (wywołanego przekrwieniem), guza (obrzęku spowodowanego zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych i wycieku białka do przestrzeni śródmiąższowej), ocieplenia (związanego ze zwiększonym przepływem krwi i aktywnością metaboliczną komórkowych mediatorów zapalenia) i bólu (ze względu na podrażnienie zakończeń nerwowych). Dysfunkcja narządów dołączyła jako piąta cecha zapalenia w



pismach Rudolfa Virchowa w latach 50. XIX wieku. Pod koniec XIX wieku Elie Metchnikoff wprowadziła koncepcję fagocytozy, fundamentalnego aspektu odporności wrodzonej, po obejrzeniu pierwotniaków pochłaniających cząstki stałe i zbadaniu leukocytów krwi przyjmujących ciała obce. W 1908 r. Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii medycyny przyznano wspólnie za to odkrycie Metchnikoff oraz Paulowi Ehrlichowi za jego pracę nad odpornością humoralną, która jest kluczowym elementem odporności adaptacyjnej (19).

W rozważaniu na temat roli lokalnego stanu zapalnego w kontekście płodności kluczowe jest rozróżnienie pomiędzy ostrym stanem zapalnym a przewlekłym stanem zapalnym o umiarkowanym bądź niskim nasileniu. W ostrej fazie odpowiedzi zapalnej komórki układu odpornościowego migrują do miejsca uszkodzenia w starannie zaplanowanej sekwencji zdarzeń, którą ułatwiają rozpuszczalne mediatory, takie jak cytokiny, chemokiny i białka ostrej fazy. W zależności od stopnia obrażeń ta ostra faza może wystarczyć do usunięcia uszkodzenia i zainicjowania procesów gojenia. Przedłużające się stany zapalne, będące wynikiem długotrwałego narażenia na stymulację lub niewłaściwej reakcji przeciwko własnym tkankom, mogą prowadzić do fazy przewlekłej, w której może wystąpić uszkodzenie tkanki i zwłóknienie. Przewlekłe zapalenie przyczynia się do wielu chorób, w tym zapalenia stawów, astmy, miażdżycy, chorób autoimmunologicznych, cukrzycy i raka, a także starzenia. Zmiany w dynamice hematologicznej, białka fazy ostrej, czynniki dopełniacza i cytokiny są wspólne dla praktycznie wszystkich stanów zapalnych i można je zmierzyć za pomocą różnych technik, jednak poszczególne biomarkery nie zostały jeszcze specyficznie powiązane z określonymi zdarzeniami patologicznymi. Tak więc, chociaż czynniki te są czułymi wskaźnikami stanu zapalnego, nie są specyficzne w kontekście identyfikacji jego przyczyny. Profil molekuł obserwowany w danym stanie zapalnym zależy od nasilenia, czasu trwania i mechanizmów zaangażowanych w proces zapalny, a także zdolności układu odpornościowego danego organizmu do reagowania i adaptacji. Interakcje komórek we wrodzonych mechanizmach immunologicznych, nabytych mechanizmach immunologicznych oraz działania mediatorów zapalnych kierują aspektami ostrego i przewlekłego stanu zapalnego leżącego u podstaw chorób wielu narządów. Skoordynowana seria mechanizmów zapalenia przyczynia się do uszkodzenia tkanek, stresu oksydacyjnego, przebudowy macierzy pozakomórkowej, angiogenezy i zwłóknienia w różnych tkankach docelowych (20).

W ostrej fazie zapalenia, bazofile i komórki tuczne uwalniają zgromadzone we własnych pęcherzykach cytoplazmatycznych mediatory. Reagenty te, uwalniane we

wczesnej fazie zapalenia, to produkty metabolizmu kwasu arachidonowego (prostaglandyny i leukotrieny) oraz histamina, które pośredniczą w rozszerzaniu naczyń i zwiększają ich przepuszczalność charakterystyczną dla ostrej odpowiedzi naczyniowej. Wydzielanie czynnika aktywującego płytki krwi (*platelet activating factor*, PAF) przez komórki tuczne również zwiększa przepuszczalność naczyń, a jednocześnie stymuluje uwalnianie mediatorów zapalenia z płytek krwi, powodując aktywację neurofilów. Inne enzymy uwalniane z komórek tucznych, które odgrywają znaczącą rolę w uszkodzeniu i naprawie tkanek, obejmują B-glukuronidazę, amylodazę i chymazę. Cytokiny działają jako przekaźniki molekularne, koordynując wzajemne oddziaływanie i kontrolę różnych typów komórek zaangażowanych w amplifikację i regulację odpowiedzi immunologicznych i zapalnych. Pojedyncza cytokina może wpływać na wiele różnych typów komórek i może wywierać zarówno działanie autokrynne, jak i parakrynne, w zależności od celu (21). Działając w mechanizmach wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, cytokiny są wydzielane głównie przez komórki fagocytarne i komórki NK, a w mechanizmach odpowiedzi nabytej są wytwarzane głównie przez komórki prezentujące antygen (*antypresenting cells*, APC) i limfocyty. Chociaż układy te są opisywane osobno, krzyżowanie się ich mechanizmów jest częste, a cytokiny stanowią główny środek komunikacji między tymi dwoma ramionami układu odpornościowego (22). Równowaga między inicjacją skutecznej odpowiedzi immunologicznej a uszkodzeniem tkanki zależy od starannej regulacji sieci cytokin. Krótki okres półtrwania cytokin sugeruje, że w normalnych warunkach większość z tych rozpuszczalnych mediatorów jest szybko eliminowana, zapewniając w ten sposób ich ograniczoną bioaktywność. Jednak w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych cytokiny mogą być uwalniane w takiej ilości, że można obserwować działanie ogólnoustrojowe (23). Wiele cytokin i chemokin odgrywa rolę w stanie zapalnym poprzez różne mechanizmy, w tym ułatwianie chemotaksji leukocytów do miejsca uszkodzenia, modulowanie funkcji komórek odpornościowych oraz stymulowanie proliferacji i różnicowania różnych typów komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną. Cytokiny, które są najbardziej znane z stymulowania i podtrzymywania odpowiedzi zapalnych to IL-6, IL-1, IL-2, IL-18, TNF-alfa, IFN-gamma i TGF-beta (21,23).

Rodzina cytokin IL-1 zawiera 11 różnych członków, z których każdy ma zarówno bezpośrednie, jak i pośrednie działanie prozapalne, w tym stymulację dalszej produkcji cytokin, uwalnianie prostaglandyn, generowanie cytotoksycznych komórek efektorowych i synergizację z czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), aby zwiększyć produkcję

komórek zapalnych w szpiku kostnym. Rodzina IL-1 może być wydzielana i wyrażana przez różne typy komórek, w tym monocyty i makrofagi. IL-1 $\beta$  jest jednym z bardziej znanych prozapalnych członków rodziny IL-1 i odgrywa ważną rolę w regulacji licznych odpowiedzi zapalnych. IL-1 $\beta$  reguluje w górę ekspresję genów i wydzielanie indukowanej syntazy tlenku azotu (*induced nitrile oxide synthase*, iNOS) i cyklooksygenazy typu 2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2), które działają w wytwarzaniu dalszych mediatorów zapalnych (np. prostaglandyna E2, PAF, tlenku azotu). IL-1 $\beta$  indukuje również ekspresję cząsteczek adhezyjnych, które zwiększają rekrutację komórek zapalnych. IL-2 zwiększa aktywność komórek NK, stymuluje produkcję cytokin zapalnych, takich jak IL-1 i IFN- $\gamma$ , i zwiększa cytotoksyczność makrofagów. Przyczynia się do przewlekłego stanu zapalnego poprzez stymulowanie aktywacji i proliferacji limfocytów T i B specyficznych dla antygeny (24).

#### 1.4.2.2. Interleukina 18.

Interleukina 18 (IL-18) jest członkiem rodziny cytokin IL-1. IL-18 wykazuje unikalną funkcję, wiążąc się ze specyficznym receptorem wyrażanym na różnych typach komórek. IL-18 pierwotnie odkryto jako czynnik zwiększający produkcję IFN-gamma z komórek Th1 (wywołuje cytotoksyczność za pośrednictwem komórek odpornościowych). Po stymulacji, naiwne komórki T przekształcają się w receptor IL-18 (IL-18R) na którym ekspresji ulegają komórki Th1, które zwiększają produkcję IFN-gamma w odpowiedzi na stymulację IL-18. IL-18 jest prozapalną cytokiną, która ułatwia odpowiedź komórkową typu 1. Ponadto IL-18 stymuluje komórki tuczne i bazofile do wytwarzania IL-4, IL-13 oraz mediatorów chemicznych, takich jak histamina (25). Udowodniono jej rolę w chorobach autoimmunologicznych.

W kontekście procesu zapłodnienia IL-18 jest biwalentną cytokiną. Poza oknem implantacji IL-18 działa, jak wspomniano, jako induktor IFN- gamma i jest postrzegana jako czynnik szkodliwy w odniesieniu do procesu implantacji. Zakłada się, że wykrycie IL-18 w macicy odzwierciedla poziom Th-1. W czasie okna implantacji zaś IL-18 staje się jednym z głównych czynników zaangażowanych w odpowiednie przygotowanie tętnic spiralnych. Jak pokazują badania, proces ten nie jest zależny od wpływu hormonów. Dotychczas nie obserwowano nieprawidłowego poziomu IL-18 w jamie macicy u pacjentek z niepłodnością idiopatyczną. Wykazano, że stężenie IL-18 w macicy jest znacznie wyższe w u kobiet ze stwierdzoną endometriozą w porównaniu do kobiet z niepłodnością pochodzenia jajowodowego. Opisywano także podwyższone stężenia IL-18 w płynie otrzewnowym u

pacjentek z endometriozą. Jedna z teorii mówi, że w przypadkach niepłodności idiopatycznej oraz u kobiet z endometriozą obniżona receptywność może być spowodowana przedwczesną aktywacją układu IL-18 (18).

Wysokie stężenia IL-18 są wykrywane w mięśniach gładkich tętnic spiralnych, a jej poziom koreluje ujemnie ze wskaźnikiem pulsacji tych tętnic. Korelacja między układem IL-18 a angiopoetyną-2 sugeruje wyjaśnienie tego związku. Angiopoetyna-2 jest kluczowym czynnikiem angiogennym, silnie wyrażanym w komórkach endometrium. Bierze udział w przebudowie maczynej strony układu krwionośnego, ale obserwowano także, że promuje unaczynienie łożyska. U pacjentek, u których stwierdza się niskie poziomy IL-18, IL-18BP i mRNA angiopoetyny-2, naczynia macicy mogą zatem nie przejść wystarczającej przebudowy, co z kolei może wyrażać się wysokim wskaźnikiem pulsacji tętnic spiralnych (18). IL-18 odpowiada za aktywację macicznych komórek NK (*uterine NK*, *uNK*) oraz indukcję produkcji metaloproteinaz (*matrix metalloproteinases*, MMP) (11).

Podsumowując – z jednej strony, IL18 w wysokich stężeniach zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego i utraty ciąży w odpowiedzi na zapalenie wewnątrzmaciczne. Z drugiej strony zaś jest niezbędna dla prawidłowej implantacji. Nie udowodniono związku jej występowania z ryzykiem wystąpienia wad reprodukcyjnych. (17). Postawiono hipotezę, że IL-18 wykrywana w macicy tuż przed pobraniem oocytów wskazuje na aktywność cytotoksycznych komórek NK, której towarzyszy rozregulowanie zarówno odporności typu 2, jak i aktywności MMP. Oba te czynniki są związane z niepowodzeniem implantacji (26). Ten zarys, choć wydaje się atrakcyjny, może być jednak zbyt uproszczony z uwagi na złożoność systemu IL-18. Wykazano, że IL-18 jest pozytywnie zaangażowana w proces implantacji u myszy i ludzi (27,28). IL-18 jest wysoce zależna od obecności (i nieobecności) innych cytokin (m.in. IL-12 i IL-4). Obecność, ilość i stosunek tych cytokin określają, czy IL-18 przesuwa układ odpornościowy w kierunku różnicowania komórek Th-2, czy sprzyja proliferacji komórek Th-1 (29). IL-18BP (głównie wyrażany w komórkach zrębu endometrium) może również zmniejszać aktywność IL-18 przez zmniejszenie odpowiedzi za pośrednictwem IFN-gamma. Ekspresja cytokin w jamie macicy nie odzwierciedla złożoności ogólnej wewnątrzkomórkowej sieci cytokin, lecz jeden rodzaj ekspresji w określonej fazie cyklu. Jednak niezależnie od podstawowej patologii, znacznie podniesiony poziom IL-18 może przewidywać niepowodzenie implantacji ze znacznym stopniem dokładności (silna ujemna wartość predykcyjna i swoistość) (28).

#### 1.4.2.3. Histamina.

Histamina jest substancją, która spełnia wszystkie kryteria mediatora zapalnego. Jej działanie manifestuje się rozszerzeniem i zwiększoną przepuszczalność naczyń. Podwyższony poziom histaminy jest wykrywany w tkance zapalnej. Histamina jest wytwarzana i przechowywana w komórkach tucznych i uwalniana na skutek oddziaływania na ich receptory powierzchniowe (30). Histamina oddziałuje poprzez wiązanie i aktywację 4 oddzielnych receptorów sprzężonych z białkiem G (*G-protein coupled receptor*, GPCR) (H1, H2, H3 i H4). GPCR są najczęstszymi receptorami aktywności biologicznej w ludzkim ciele; pośredniczą w działaniu ogromnej liczby cząsteczek, w tym epinefryny, acetylocholiny, histaminy i leukotrienów. Nieaktywne i aktywne formy histaminy istnieją w dynamicznej równowadze. Podanie histaminy przekształca nieaktywny receptor w jego formę aktywną. Leki przeciwhistaminowe wywołują odwrotną reakcję. Inaktywacja następuje w mechanizmie reakcji sterycznej. Większość efektów histaminy związanych z reakcjami alergicznymi zachodzi za pośrednictwem receptora H1, nieliczne poprzez receptory H2 i H3, a prawdopodobnie także przez receptor H4. Działając poprzez receptory H1, H2 i H3 w OUN, histamina pośredniczy w czuwaniu, czujności i czasie reakcji. Blokowanie działania histaminy w OUN może zatem wywoływać senność i upośledzenie czynności z lub bez senności (31). Receptor H1 znajduje się na naczyniach krwionośnych i nerwach czuciowych. Najważniejsze działania receptora H1 to zwiększenie przepuszczalności naczyń, stymulacja nerwów i promowanie chemotaksji eozynofili, co w efekcie może powodować przekrwienie błony śluzowej. Receptor H1 jest głównym receptorem odpowiedzialnym za objawy nieżyty nosa. Receptor H2 zawsze uważany był za receptor kwasu żołądkowego, co prawdopodobnie jest jego główną aktywnością. Znajduje się jednak w łożysku naczyniowym i wiadomo, że aby zablokować wszystkie ogólnoustrojowe działania histaminy, potrzebna jest kombinacji zarówno leków przeciwhistaminowych H1, jak i H2. Aktywacja receptora H2 prawdopodobnie również przyczynia się do zwiększonej przepuszczalności naczyń spowodowanej stymulacją receptora H1 (31).

Ekspresja histaminy jest wyrażona także w endometrium, gdzie odgrywa rolę przekaźnika parakrynnego podczas decydualizacji i implantacji zarodka. Analiza obecności białek transportowych dla histaminy wykazała ich obecność zarówno podczas fazy proliferacyjnej, jak i wydzielniczej (32). Decydualizacja, stymulowana przez estradiol i progesteron, obejmuje obrzęk i przekrwienie, dwa klasyczne działania histaminy (33).

Ponadto wykazano, że zwiększone wydzielanie płynu z powodu zwiększonej przepuszczalności naczyń włosowatych w miejscu implantacji u gryzoni jest zależne od histaminy uwalnianej przez blastocystę (34). Postuluje się zatem, że mediatory zapalne, w tym histamina, które są zwykle uwalniane podczas naprawy i przebudowy tkanek, są ważnymi mediatorami decydualizacji i implantacji. Z kolei wewnątrzmaciczne zastosowanie inhibitorów lub antagonistów receptorów histaminowych hamuje tworzenie doczesnej (35).

Komórkowe pochodzenie histaminy endometrium jest nadal kontrowersyjne. Wędrowe komórki tłuszczne są dobrze znanym źródłem histaminy i są obecne w ludzkim endometrium i płynie w świetle macicy (36). Jednak niektóre obserwacje sugerują, że komórki tłuszczne mogą nie być źródłem histaminy w endometrium. Implantacja przebiega w sposób niezakłócony u myszy z niedoborem komórek tłuszcznych, a także u gryzoni leczonych stabilizatorem komórek tłuszcznych (35). Wychwyt histaminy ze środowiska przez specyficzne białka transporterowe stanowi alternatywne źródło histaminy endometrium. Nawet bardzo niskie stężenie histaminy we krwi i płynach pozakomórkowych może służyć jako substrat dla transporterów o wysokim powinowactwie w komórkach endometrium. Ekspresja białek transportujących wzrasta w odpowiedzi na czynnik uwalniający histaminę (*histamine-releasing factor*, HRF) wydzielany przez zarodek w celu stymulacji reakcji doczesnej i wsparcia implantacji (32).

Histamina jest cząsteczką niezbędną w procesie implantacji. Promuje inwazję cytotrofoblastu poprzez aktywację receptora H1. Stymulacja H1 następuje przez mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia szlakiem trifosforanu inozytolu. Histamina nie wpływa jednak na proliferację ani adhezję trofoblastu (37). Jak zaobserwowano, blastocysta ma zdolność wytwarzania histaminy. U królików, którym zaaplikowano w okresie okna implantacyjnego do światła macicy roztwór DL-alfa-metylohistydyny, inhibitora dekarboksylazy histydynowej, zaobserwowano spadek wskaźnika implantacji o ponad 60%. Iniekcje z L-histydyny (prekursora histaminy) nie wpłynęły na proces implantacji (34). Zbadano także związek między histaminą a estrogenami podczas inicjacji implantacji u szczura. Stwierdzono, że histamina poprawia wskaźnik implantacji pomimo suboptymalnego poziomu estradiolu u szczurów po usunięciu jajników, którym podawano medroksyprogesteron (syntetyczną pochodną progesteronu pozbawioną działania androgennego i estrogennego). Zaobserwowano, że działanie histaminy wyrażone jest zarówno przez receptory H1 jak i H2, a jest hamowane przez leczenie kombinacją

inhibitorów receptorów H1 i H2 (mepiraminy i metiamidu) – pojedyncze hamowanie receptorów H1 lub H2 nie wywierało negatywnego efektu na proces implantacji (38).

Histamina przyczynia się do interakcji między zarodkiem i macicą poprzez jej właściwości wazoaktywne, różnicujące i stymulujące wzrost. Enzym degradujący histaminę, oksydaza diaminowa (*diamin oxidase*, DAO), jest wytwarzany w dużych ilościach przez łożysko i działa jako bariera metaboliczna, aby zapobiec nadmiernemu wchodzeniu bioaktywnej histaminy z łożyska do krążenia matki lub płodu. Pomiar ELISA wykazał specyficzny dla ciąży wzrost poziomu DAO w osoczu około 7. tygodnia ciąży, zbieżny z inwazją naczyniową trofoblastu (39). Wysoka ekspresja dekarboksylazy histydynowej (enzymu przekształcającego L-histydynę w histaminę) w łożysku, obecność receptorów histaminowych na granicy maczyno-płodowej oraz istnienie zarodkowego czynnika uwalniającego histaminę (*embryonic histamine-releasing factor*, EHRF) sugerują fizjologiczną rolę histaminy podczas ciąży. Równowaga między histaminą a DAO wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla prawidłowego przebiegu ciąży. Stwierdzono zmniejszoną aktywność DAO w wielu heterogenicznych powikłaniach ciąży, takich jak cukrzyca, zagrażające poronienie czy zaburzenia trofoblastyczne. U kobiet z wczesnie ujawniającym się stanem przedrzucawkowym poziomy DAO były znacznie niższe (40%) w porównaniu do grupy kontrolnej w pierwszym trymestrze ciąży, ale nie wykazały żadnej różnicy w pomiarach w połowie ciąży (39). Niska aktywność DAO może wskazywać na ciążę wysokiego ryzyka, chociaż duże różnice wewnątrz- i międzyosobnicze ograniczają jego wartość jako narzędzia przesiewowego (40).

#### 1.4.3. Rola transporterów glukozy.

Transportery glukozy (*glucose transporters* - GLUT) są odpowiedzialne za transport glukozy przez błony komórkowe. Spośród 14 członków całej rodziny, ekspresję dziewięciu odnotowano w macicy mysiej, a siedmiu w macicy ludzkiej. Jak pokazują badania, odpowiedni wychwyt i metabolizm glukozy są niezbędne do prawidłowego różnicowania endometrium macicy w kierunku stanu receptywnego umożliwiającego implantację zarodka. Pierwszym etapem wykorzystania glukozy jest jej pobieranie do komórki, w którym pośredniczą albo transportery glukozy sprzężone z sodem (*sodium-glucose linked transporter*, SGLT, obecnie znane jako rodzina SLC5) lub – obecne w większości komórek ssaków - facylitujące transportery glukozy (GLUT, obecnie znane jako rodzina SLC2) (41).

W czasie implantacji w komórkach zrębu endometrium oraz doczesnej zachodzą zmiany metaboliczne, z których najwyraźniej zaznaczoną jest akumulacja glikogenu (42). Prawidłowa decydualizacja komórek endometrium *in vitro* zależy od odpowiednich stężeń glukozy – wykazano, że komórki hodowane w stężeniach glukozy poniżej 2,5 mM wykazują niższe zaawansowanie decydualizacji (43). Cytochalazyna B, selektywny inhibitor transporterów glukozy, osłabia wychwyt glukozy przez komórki zrębu endometrium, co wskazuje, że w jej wychwytywaniu uczestniczą receptory klasy I lub klasy III z rodziny SLC2. Najlepiej dotychczas opisanym i najliczniejszym w zrębie endometrium transporterem glukozy jest SLC2A1 (GLUT1). Jego ekspresja zwiększa się w procesie decydualizacji zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto, *in vitro* rozkład GLUT1 w komórkach zrębu endometrium reguluje w dół ekspresję kluczowych markerów decydualizacji. Dane te wskazują, że GLUT1 odgrywa kluczową rolę w przygotowaniu endometrium do implantacji zarodka i dostarcza dodatkowych przekonujących danych, że zwiększony wychwyt glukozy jest warunkiem wstępnym prawidłowej decydualizacji. Zmiana stężenia glukozy w surowicy u matki, jej wychwyt przez GLUT1 lub dalszy metabolizm glukozy może prowadzić do niepowodzenia implantacji, a następnie poronienia i utraty ciąży. Poziomy ekspresji białka GLUT1 w biopsjach endometrium u kobiet z idiopatyczną niepłodnością były niższe aniżeli u kobiet z niepłodnością z powodu niedrożności jajowodów lub przyczyn męskich (44). Barwienie immunohistochemiczne ujawniło, że spadek ten był specyficzny dla komórek zrębu endometrium, a nie nabłonka gruczołowego. Zatem, na podstawie dowodów *in vitro*, idiopatyczną niepłodność u niektórych pacjentów można potencjalnie przypisać zmniejszonemu wychwytowi glukozy przez komórki zrębu błony śluzowej macicy z powodu niższej ekspresji GLUT1. Ponadto, nieprawidłowa ekspresja innych GLUT, takich jak GLUT3 i GLUT8, może odgrywać rolę w patogenezie niepłodności, ponieważ oba z nich ulegają umiarkowanej lub wysokiej ekspresji w komórkach endometrium i są regulowane w górę podczas procesu decydualizacji (41). Nie ma natomiast danych dotyczących roli GLUT4 w niepłodności o nieustalonej przyczynie.

GLUT4 jest prawdopodobnie najlepiej zbadanym transporterem ze względu na główną rolę, jaką odgrywa w homeostazie glukozy w całym ciele i patogenezie cukrzycy typu II (45). GLUT4 ulega ekspresji przede wszystkim w wrażliwym na insulinę mięśniu szkieletowym i tkance tłuszczowej. Insulina uwalniana przez trzustkę w odpowiedzi na wysokie poziomy glukozy daje sygnał dla GLUT4 do translokacji z przedziału wewnątrzkomórkowego do błony plazmatycznej, powodując szybki 10- do 40-krotny



wzrost wychwytu glukozy przez te komórki. Wady stymulowanej insuliną translokacji GLUT4 w mięśniach szkieletowych są odpowiedzialne za oporność na insulinę obserwowaną w otyłości i cukrzycy typu II. Ponadto ekspresja GLUT4 zmienia się w tkance tłuszczowej w stanach otyłości i insulinooporności (46).

Dane dotyczące ekspresji GLUT4 w macicy są ograniczone. Ekspresję białka GLUT4 i mRNA zaobserwowano po raz pierwszy w macicy szczura, w stężeniach znacznie poniżej stężeń obserwowanych w mięśniu szkieletowym (47). Inna grupa badaczy przedstawiła dowody immunohistochemiczne, że GLUT4 ulega ekspresji w nabłonku macicy, gruczołach i zrębie macicy nieciążarnej szczura oraz w doczesnej do 8 dnia ciąży (48). Oba te badania wykazały również, że podczas gdy inne GLUT, takie jak GLUT1 i 3, były zlokalizowane głównie na błonie plazmatycznej, GLUT4 było rozmieszczone między powierzchnią komórki a cytoplazmą. Ta lokalizacja jest zgodna ze zdolnością GLUT4 do translokacji do błony plazmatycznej z przedziału międzykomórkowego i zwiększenia wychwytu glukozy w odpowiedzi na odpowiednie bodźce. Istnieją dowody, iż mRNA Slc2a4 można znaleźć w zrębie mysiego endometrium, ale na poziomach, które są od 100 do 1000 razy niższe niż w przypadku innych, powszechniej występujących GLUT (43). Dane dotyczące GLUT4 w ludzkiej tkance macicy są jeszcze bardziej ograniczone oraz sprzeczne. Badanie ekspresji GLUT4 w ludzkiej macicy za pomocą Northern blot wykluczyło obecność tego receptora (44). Z kolei doniesienia analizujące biopsje ludzkiego endometrium wykazały obecność mRNA GLUT4 w komórkach nabłonkowych (49).

Chociaż potrzebne są dalsze badania dotyczące ekspresji i funkcji GLUT4 w macicy, przedstawione dotychczas dane wskazują, że poziomy tego transportera w endometrium są bardzo niskie, co może wyjaśniać sprzeczne doniesienia.

### 1.5. Endometrial scratching.

Endometrial scratching, czyli tak zwany kontrolowany uraz endometrium, to technika proponowana w celu ułatwienia implantacji zarodka i zwiększenia prawdopodobieństwa zajścia w ciążę u kobiet leczonych technikami rozrodu wspomaganego (*assisted reproductive technology*, ART). Polega na zarysowaniu błony śluzowej macicy za pomocą plastikowego cewnika do biopsji o średnicy około 3 mm. Procedurę wykonuje się zazwyczaj między dniem 3 cyklu poprzedzającego cykl IVF a dniem 3. cyklu IVF (gdzie dzień 1 cyklu IVF to pierwszy dzień miesiączki lub krwawienie z odstawienia lub dzień przed pierwszym dniem stymulacji w przypadku braku krwawienia) (50).

Postuluje się, że uszkodzenie lub „zadrapanie” endometrium, które powstaje w wyniku biopsji, może ułatwić implantację zarodka przez mechanizmy zapalne i immunologiczne (51). Sumaryczne wyniki z randomizowanych badań sugerują korzyści z tej procedury, szczególnie u kobiet, u których wcześniej implantacja się nie powiodła (52). Mechanizm, dzięki któremu uraz endometrium może prowadzić do poprawy wyniku in vitro u kobiet z nawracającymi niepowodzeniami implantacji (*repeated implantation failure*, RIF), pozostaje niejasny. Pomyślna implantacja wymaga synchronicznego rozwoju endometrium i zarodka. Sugerowano, że powtarzające się niepowodzenia IVF mogą być związane z asynchronizacją endometrium ze stadium zarodka (53), a w precyzyjniej - rozwój endometrium w cyklach IVF może być bardziej zaawansowany niż w cyklach naturalnych o 2–4 dni (54). Postuluje się, że miejscowe uszkodzenie endometrium w stymulowanych cyklach opóźnia rozwój endometrium z powodu procesu gojenia, a tym samym koryguje asynchronię między etapami endometrium i zarodka (55). W cyklach naturalnych implantacja zarodka zachodzi podczas okna implantacyjnego endometrium, które jak już opisano charakteryzuje się ekspresją szeregu czynników przez komórki nabłonka śluzówki macicy, w tym cząsteczek adhezyjnych, cytokin, czynników wzrostu i enzymów. Proces naprawy po miejscowym uszkodzeniu jest związany ze zwiększoną produkcją tych czynników (53,56). Pośredniczą w nim częściowo także czynniki immunologiczne, z których niektóre są zaangażowane w proces implantacji zarodka. Jedno z badań wykazało zwiększoną ekspresję TNF-alfa, IL-15 i innych mediatorów odpornościowych w endometrium kobiet, które przeszły biopsję podczas fazy proliferacyjnej tego samego cyklu (57). TNF-alfa jest kluczową cytokiną prozapalną i zwiększa produkcję wielu innych cytokin, w tym LIF, IL-11, IL-6, IL-18 oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, z których wszystkie mają odgrywać rolę w procesie implantacji, stwarzając środowisko typowe dla ostrego stanu zapalnego (58). Wykazano również, że uraz endometrium przeprowadzony w fazie proliferacyjnej cyklu zwiększył liczbę komórek uNK, których poziom został obniżony w procesie stymulacji jajników (59). Uważa się, że komórki te również odgrywają rolę w implantacji, a ich nieprawidłowe poziomy zaobserwowano u kobiet z niepowodzeniami rozrodu, w tym nawracającymi poronieniami oraz nawracającymi niepowodzeniami implantacji po IVF (60,61).

Niestety, wiele przeprowadzonych badań ma ograniczenia metodologiczne, w tym niewielki rozmiar oraz niejasne metody randomizacji.

## 2. Cel pracy.

Jak pokazują statystyki, na całym świecie coraz więcej par zмага się z problemem niepłodności. W około 20% przypadków, pomimo wnikliwej diagnostyki, nie udaje się ustalić jej przyczyny. Kluczowym dla zaistnienia ciąży momentem jest implantacja blastocysty w jamie macicy. Pomimo licznych badań, procesy zachodzące w obrębie błony śluzowej macicy u kobiet w okresie okołointplantacyjnym wciąż nie zostały w pełni poznane. Liczba czynników biorących udział w tym procesie oraz ich wzajemne interakcje wciąż stanowią szerokie pole do badania dla naukowców. Ponadto, uzyskanie reprezentatywnego materiału do przeanalizowania implantacji u człowieka oraz interakcji endometrium z zarodkiem *in vivo* pozostaje wyzwaniem metodologicznym – z uwagi na kwestie etyczne oraz fakt, iż nie da się zbadać procesu implantacji *in vivo* bez jego zakłócenia. Niemniej, solidnie udokumentowana pozostaje rola zapalenia i związanego z nim czynnikami molekularnymi dla receptywności endometrium oraz powodzenia zagnieżdżenia, pomimo kontrowersji wokół celowego wywoływania kontrolowanego urazu endometrium (*endometrial scratching*).

Postanowiono zbadać, czy poziomy wybranych molekuł prozapalnych – interleukiny 18 oraz histaminy, a także transportera glukozy GLUT4 różnią się w populacji kobiet z niepłodnością o nieustalonej etiologii w porównaniu z kobietami posiadającymi naturalnie poczęte potomstwo.

Cele szczegółowe:

- I. Analiza poziomu interleukiny 18 oraz histaminy jako cząsteczek o postulowanej roli w procesie implantacji w receptywnym endometrium u kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii oraz porównanie go do grupy kobiet posiadających naturalnie poczęte potomstwo.
- II. Ocena korelacji poziomów interleukiny 18 i histaminy w receptywnym endometrium oraz we krwi jako próba odnalezienia użytecznego diagnostycznie markera receptywności.
- III. Analiza poziomu GLUT4 w receptywnym endometrium kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii i porównanie go z kobietami posiadającymi naturalnie poczęte potomstwo.

### 3. Materiał i metodyka.

Przeprowadzono badanie prospektywne, przekrojowe. Projekt badania uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr 1072.6120.78.2017 z dn. 29. czerwca 2017 r. Środki finansowe pozyskano z dotacji celowej nr K/DSC/00421 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

#### 3.1. Charakterystyka materiału klinicznego.

Materiał badawczy stanowiła grupa 58 kobiet ze zdiagnozowaną niepłodnością pierwotną, zaś grupę kontrolną 8 pacjentek posiadających naturalnie poczęte potomstwo. Pacjentki rekrutowano spośród kobiet hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii Ginekologicznej i Ginekologii celem przeprowadzenia diagnostyki hormonalnej, konsultowanych w Poradni Endokrynologii Ginekologicznej oraz diagnozowanych w ramach Programu Kompleksowej Ochrony Zdrowia Prokreacyjnego w okresie od listopada 2017 do marca 2019.

Kryteria włączenia do grupy badanej spełniały pacjentki w wieku reprodukcyjnym (18-40 lat) cierpiące z powodu niepłodności pierwotnej (bezsukteczne starające się o ciążę przez ponad rok), miesiączkujące regularnie, nie stosujące terapii hormonalnej.

Kryteria wykluczenia stanowiły: stwierdzony czynnik męski niepłodności, czynnik jajowodowy, endometrioza, stany zapalne w obrębie miednicy mniejszej – aktualnie i w wywiadzie, podłoże hormonalne niepłodności, otyłość, insulinooporność, przebyte co najmniej jedno poronienie oraz choroby przewlekłe o podłożu autoimmunologicznym.

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej spełniały pacjentki w wieku reprodukcyjnym (18-40 lat) posiadające naturalnie poczęte potomstwo w wieku do trzech lat, miesiączkujące regularnie.

Kryteria wykluczenia stanowiły: stan po przebytych operacjach na macicy, w tym po wyłyżeczkowaniu jamy macicy, endometrioza, stany zapalne w obrębie miednicy mniejszej – aktualnie i w wywiadzie, przebyte co najmniej jedno poronienie, otyłość, insulinooporność, choroby przewlekłe o podłożu autoimmunologicznym, okres karmienia piersią.

Pacjentki z obu grup zrekrutowane do badania zapraszano na wizytę w okresie okna implantacyjnego. Stosowny moment cyklu był określany na podstawie monitoringu owulacji. Pacjentki zgłaszały się około 10. dnia cyklu celem obserwacji wzrastania pęcherzyka dominującego. Badanie powtarzano po 3-4 dniach. W przypadku potwierdzenia wzrastania

pęcherzyka dominującego, na 16 dni przed spodziewanym wystąpieniem miesiączki pacjentka samodzielnie wykonywała w domu test LH z moczu. Pacjentki zgłaszały 6-8 dni po piku LH lub w przypadku wątpliwego wyniku testu, w połowie fazy lutealnej określonej na podstawie podawanej długości cykli miesięczkowych – 8-4 dni przed dniem spodziewanej miesiączki. W trakcie wizyty wykonywano badanie ultrasonograficzne celem potwierdzenia przebytej owulacji (obserwacja ciała żółtego w tożsamym jajniku, endometrium o szerokości co najmniej 10mm).

Pacjentki były informowane o konieczności rezygnacji ze współżycia w cyklu, w którym prowadzono badanie, co potwierdzano w dokumentacji badania. Pacjentki nieakceptujące tego wymogu nie mogły zostać zakwalifikowane do badania.

W trakcie wizyty, po potwierdzeniu przebytej owulacji, wykonywano biopsję aspiracyjną endometrium za pomocą plastikowej pipety o średnicy ok. 3mm (Pipelle Endometrial Suction Curette). Jeśli występowały trudności w penetracji kanału szyjki przez pipetę, chwytało się górną wargę szyjki macicy przy użyciu kulociągu. W przypadku silnych dolegliwości bólowych u pacjentki lub braku możliwości penetracji kanału szyjki macicy odstępowano od pobrania. Bezpośrednio po badaniu proszono pacjentki o określenie nasilenia bólu w trakcie procedury liczbowo w skali NRS (*numerical rating scale*), gdzie 0 to całkowity brak bólu, a 10 to najgorszy wyobrażalny ból. U żadnej pacjentki nie wystąpiły powikłania. Pobraną próbkę endometrium zabezpieczano w roztworze 10% neutralnej, zbuforowanej formaliny w temperaturze pokojowej, a następnie przekazywano do Zakładu Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej CMUJ celem utrwalenia w bloczkach parafinowych.

W tym samym dniu od każdej pacjentki pobierano próbkę krwi żyłnej o objętości 5 ml na EDTA. Krew odwirowywano przez 15 minut przy 3000 obr./min., a surowicę przekazywano do Katedry Biochemii Klinicznej CM UJ celem oznaczenia poziomu IL-18 oraz histaminy.

### 3.2. Metodyka badań immunohistochemicznych.

#### 3.2.1. Oznaczanie IL-18, histaminy i GLUT4 w endometrium.

Materiał tkankowy utrwalano w formaldehydzie przez 24 godziny. Następnie odwodniono go w 70% roztworze etanolu, po czym zatopiono w parafinie. Tkanki podzielono na skrawki o grubości 4 µm i zamocowano na szkiełkach silanizowanych.

Skrawki podzielono na trzy równe zestawy. Preparaty parafinowe odparafinowano (3 zmiany ksyleny w temp. pokojowej; pierwsza zmiana - 10 min, druga i trzecia po 15 min.) i nawodniono (3 zmiany alkoholu w temp. pokojowej, po 5 min. każda). Następnie preparaty inkubowano w temp. pokojowej przez 10 min. w 3% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w celu zablokowania endogennej peroksydazy. Preparaty przepłukano w wodzie destylowanej i inkubowano z buforem TBS przez 5 minut. Następnie preparaty odmaskowano za pomocą buforu cytrynianowego o pH 6,0 w łaźni wodnej w temp. 97 °C. Po odmaskowaniu preparatów nałożono preparat Ultra Vision Protein Block (Thermo Scientific) na 5 min. w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej. Następnie nałożono stosowne przeciwciało i inkubowano w temp. pokojowej w komorze wilgotnej przez określony czas (Tab. 1.). Pierwszy zestaw skrawków inkubowano z króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi reaktywnymi z IL-18 (Recombinant IL18 (Tyr37~Asp193), Cloud-Clone Corp., 0,33 mg/ml nr katalogowy PAA064HU01) w rozcieńczeniu 1:100 przez 60 min. Drugi zestaw inkubowano z króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi reaktywnymi z histaminą (Recombinant human histamine (Met1~Ile163), Cloud-Clone Corp., 0,35mg/ml, nr katalogowy PAA927Ge01) w rozcieńczeniu 1:100 przez 30 min. Trzeci zestaw inkubowano z króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi (Recombinant human GLUT4 (Met1~Ile163) Cloud-Clone Corp., nr katalogowy PAC023HU01) w rozcieńczeniu 1:50 przez 30 min.

Nadmiar przeciwciała przepłukano buforem TBS i nałożono preparat Post antibody blocking for Bright Vision plus (BrightVision+ Goat anti-mouse/rabbit HRP – zestaw ImmunoLogic). Inkubujemy w komorze wilgotnej, w temperaturze pokojowej przez 20 min. Nadmiar odczynnika spłukano buforem TBS i nałożono preparat poly-HRP–GAMs/Rb IgG (BrightVision+ Goat anti-mouse/rabbit HRP – zestaw ImmunoLogic). Inkubowano w temp. pokojowej, w komorze wilgotnej, przez 30 min. Nadmiar odczynnika odpłukano buforem TBS i nałożono DAB Quanto (Thermo Scientific). Inkubowano w temp. pokojowej, w komorze wilgotnej, przez ok. 5 min. Następnie odpłukano nadmiar odczynnika wodą destylowaną i podbarwiono preparaty hematoksyliną (Thermo Scientific). Preparaty odwodniono przeprowadzając przez szereg trzech zmian alkoholu i ksyleny w rosnących stężeniach. Zamknięto szkiełkiem nakrywkowym (CYTOSEAL firmy ThermoScientific). Ekspresja każdej z cytokin była oceniana półilościowo jako liczba dodatnich komórek na milimetr kwadratowy w analizowanej próbce, obliczona przy użyciu analizatora obrazu.

Tabela 1. Stopnie rozcieńczenia i czasy inkubacji poszczególnych przeciwciał.

<b>Przeciwciało</b>	<b>Klon</b>	<b>Rodzaj przeciwciała</b>	<b>Producent</b>	<b>Rozcieńczenie przeciwciała</b>	<b>Czas inkubacji z przeciwciałem</b>	<b>Odmaskowanie</b>
IL-18	-	poliklonalne	CloudClone	1:100	60 min.	bufor cytrynianowy pH 6,0
Histamina	-	poliklonalne	CloudClone	1:100	30 min.	bufor cytrynianowy pH 6,0
GLUT4	-	poliklonalne	CloudClone	1:50	30 min.	bufor cytrynianowy pH 6,0

### 3.2.2. Oznaczanie IL-18 i histaminy we krwi.

Oznaczenie poziomu IL-18 w surowicy przeprowadzono przy użyciu metody ELISA, z wykorzystaniem ludzkiej, rekombinowanej IL-18 (Human IL-18 ELISA Kit, Biorbyt, nr katalogowy orb50153). Próbkę krwi oraz reagenty ogrzano do temperatury 37 °C, a następnie rozcieńczono za pomocą rozcieńczalnika, w stosunku 1:2 używając 50 µl buforu, całkowicie i równomiernie mieszając. Roztwór rozdysponowano po 0,1 ml na studzienkę. Płytkę mikrolitrową ze studzienkami zabezpieczono pokrywką i inkubowano w 37 ° C przez 90 min. Następnie płytkę osuszono, dodano 0,1 ml biotynylowanego roztworu roboczego przeciwciała przeciw ludzkiej IL-18 do każdego dołka i inkubowano w 37 ° C przez 60 min. Następnie płytkę przepłukano trzy razy w 0,01 M TBS (sól fizjologiczna buforowana TRIS), za każdym razem pozostawiając bufor do płukania w studzience przez 1 min. Bufor usunięto i osuszono płytkę, po czym dodano 0,1 ml przygotowanego roztworu awidyny-biotyny-peroxydazy (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) do każdej studzienki i inkubowano płytkę w 37 ° C przez 30 min. Ponownie przepłukano

płytkę, tym razem 5 razy, 0,01 M TBS i za każdym razem pozostawiano bufor do płukania w studzienkach na 1-2 min. Bufor usunięto i osuszono płytkę, po czym dodano 90 µl barwnika TMB do każdej studzienki i inkubowano płytkę w 37 ° C przez 10 min. Dodano 0,1 ml roztworu barwnika kontrastowego TMB do każdego dołka, po czym niezwłocznie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm.

Oznaczenie poziomu histaminy w surowicy przeprowadzono metodą ELISA, z wykorzystaniem odczynnika Histamin ELISA Immundiagnostik, nr katalogowy K 8212. Koncentrat buforu płuczącego (WASHBUF B) rozcieńczono w stosunku 1:10 w czystej wodzie. Odczynniki doprowadzono do temperatury pokojowej. Próbkę osocza zmieszano z odczynnikiem derywatyzującym. Derywatyzowana próbka była następnie inkubowana na poziomej wytrząsarce razem z poliklonalnym przeciwciałem histaminowym wyznakowanym peroksydazą na płycie ELISA pokrytej pochodną histaminy przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie zawartość studzienek przepłukano 5 razy 250 µl bufora do płukania. Po ostatnim etapie usunięto pozostałości bufora za pomocą bibuły. Następnie odmierzone pipetą 100 µl substratu (SUB) do każdego dołka, inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Dodano 100 µl roztworu barwnika kontrastowego do każdego dołka. Niezwłocznie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm. Wyniki wyrażono w pikogramach na mililitr.

### 3.3. Metodyka analizy statystycznej.

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica (StatSoft 13.3). Test normalności Shapiro-Wilka badanych zmiennych oraz przedstawione wykresy częstości wykazały brak normalności rozkładu zmiennych. Do porównania grupy badanej i kontrolnej zastosowano testy nieparametryczne Walda-Wolfowitza oraz U Manna-Whitneya. Test istotności współczynnika korelacji oparto o statystykę dla rozkładu t-Studenta.

## 4. Wyniki.

### 4.1. Analiza ogólna.

Łącznie analizie poddano 66 próbek endometrium oraz 66 próbek krwi. Trzy pacjentki wstępnie zakwalifikowane do badania ostatecznie wykluczono, z uwagi na trudności techniczne przy pobieraniu materiału w dwóch przypadkach (brak możliwości



spenetrowania kanału szyjki macicy za pomocą cewnika do biopsji) oraz dolegliwości bólowe w jednym przypadku.

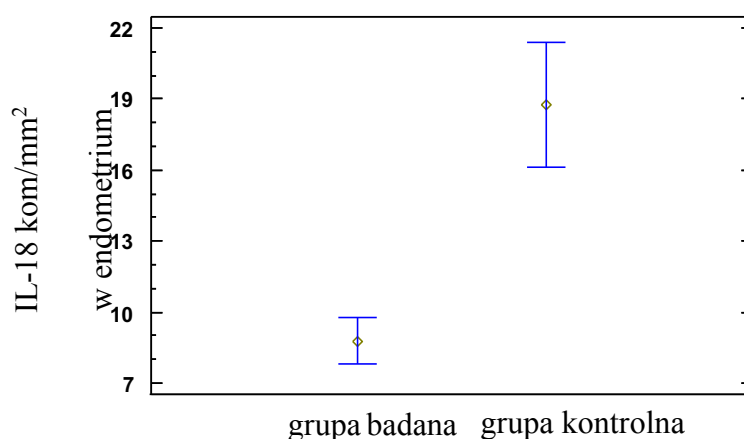
W grupie badanej starania o ciążę trwały średnio 24 miesiące (mediana 22 miesiące). Długość cykli miesięczkowych wynosiła średnio 28,5 dnia (mediana 28 dni).

Pacjentki z grupy kontrolnej posiadały jedno lub dwoje dzieci. Miesiączkowały średnio co 28,75 dnia (mediana 28 dni).

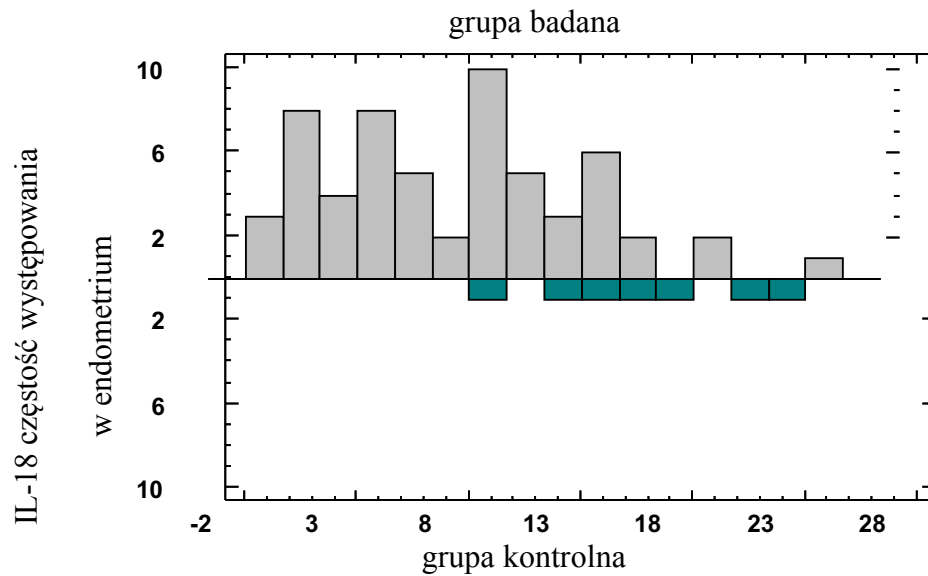
Pacjentki z obu grup cechowała prawidłowa masa ciała (wskaźnik body mass index, BMI, poniżej 25). U wszystkich pacjentek w badaniu histopatologicznym endometrium potwierdzono stadium sekrecji. U żadnej pacjentki nie wykryto patologii w badaniu histopatologicznym. Poziom dolegliwości bólowych w trakcie procedury pobierania biopsji endometrium pacjentki oceniły na średnio 5 punktów w 10-stopniowej skali NRS.

#### 4.2. Ocena poziomu IL-18 w endometrium.

Jak pokazują wyniki przeprowadzonej analizy, poziom IL18 jest w sposób istotny statystycznie wyższy u kobiet posiadających potomstwo aniżeli u kobiet obciążonych niepłodnością idiopatyczną (Ryc. 4.1. i 4.2.)



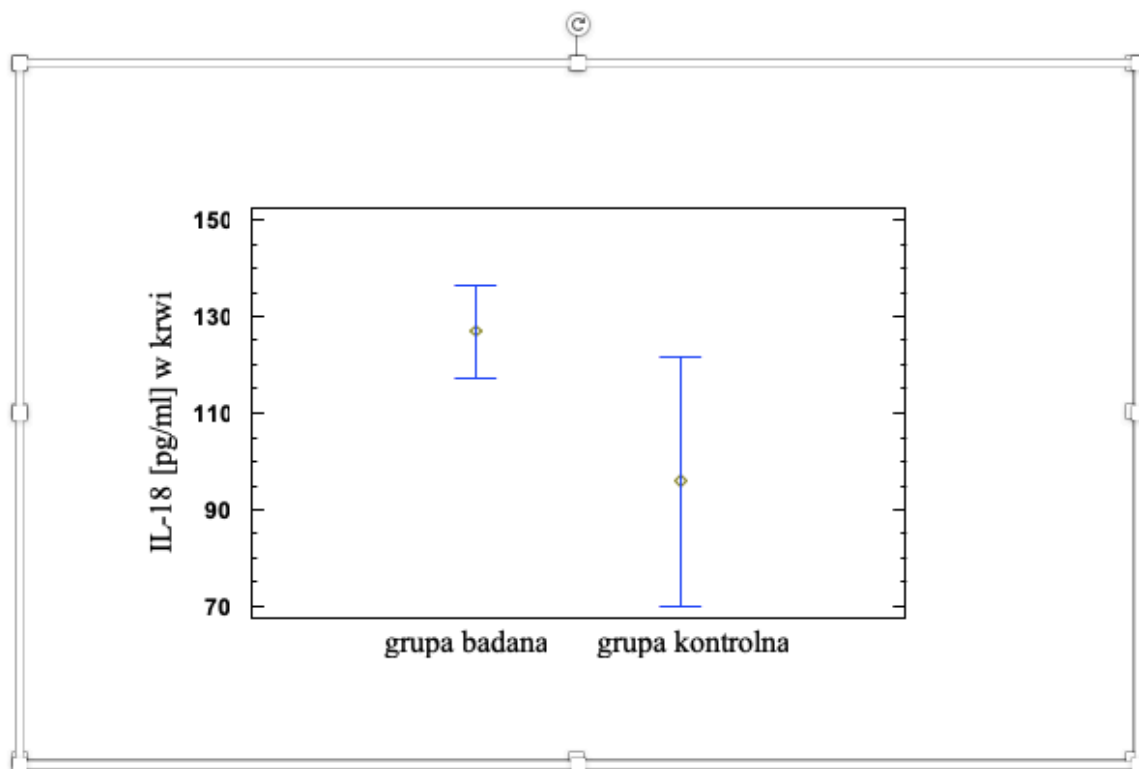
Rys. 4.1. Średnie i przedziały ufności dla poziomu IL-18 w endometrium.



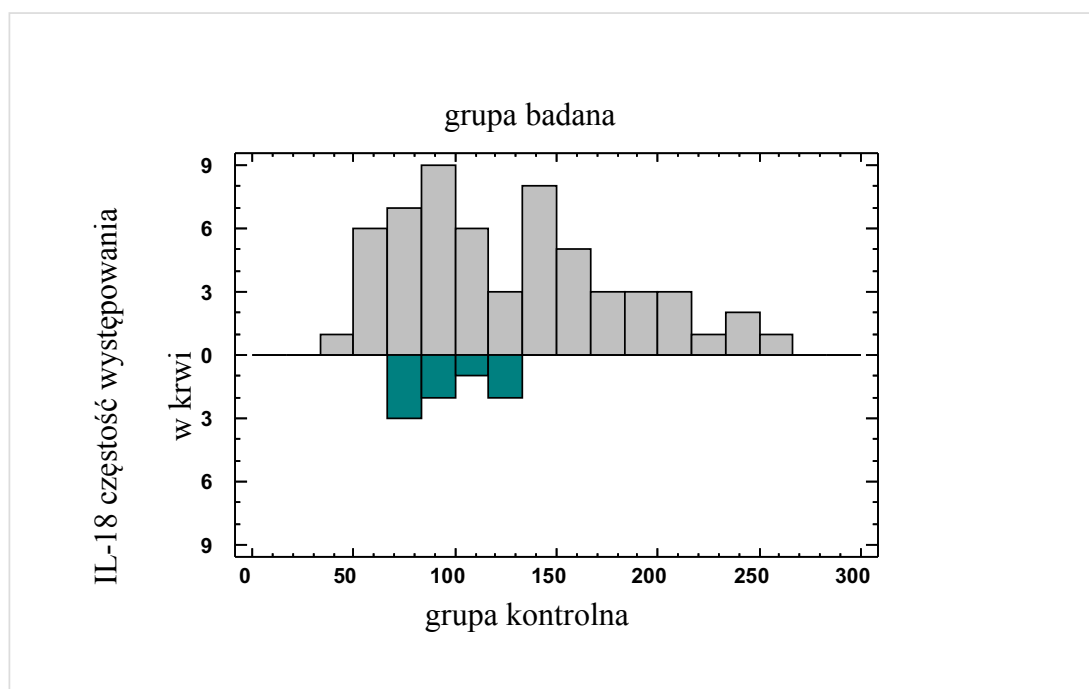
Ryc. 4.2. Częstości obserwowanych wartości IL-18 w endometrium.

#### 4.3. Ocena poziomu IL-18 we krwi.

W badanej grupie nie wykazano różnicy między poziomem IL-18 we krwi u kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo (Ryc. 4.3 i 4.4).



Ryc. 4.3. Średnie i przedziały ufności dla poziomu IL-18 we krwi.

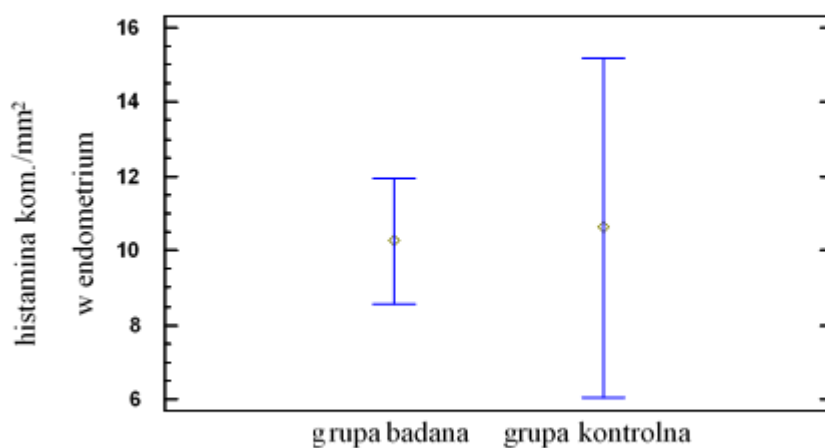


Ryc. 4.4. Częstości obserwowanych wartości IL-18 we krwi.

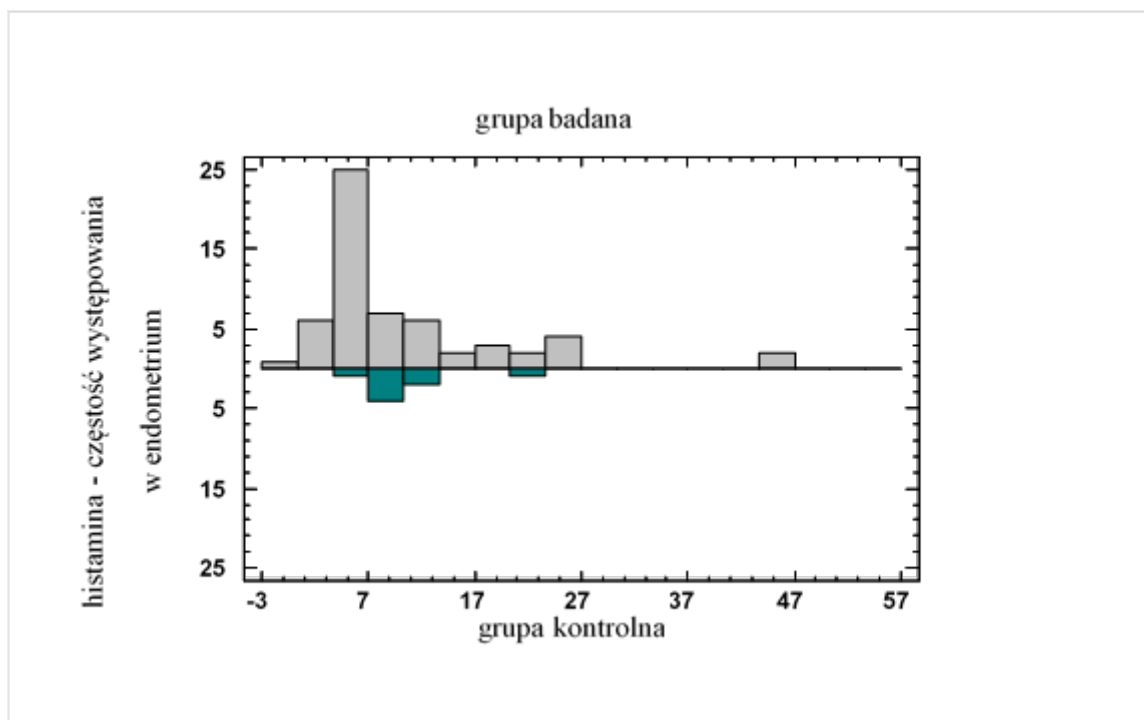
Dla wartości IL-18 we krwi stwierdzono różnicę, która przy większej liczbie grupy kontrolnej mogłaby być istotna statystycznie z uwagi na zawężenie przedziału ufności.

#### 4.4. Ocena poziomu histaminy w endometrium.

Nie wykazano różnicy między poziomem histaminy w receptywnym endometrium kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo (Ryc. 4.5, 4.6).



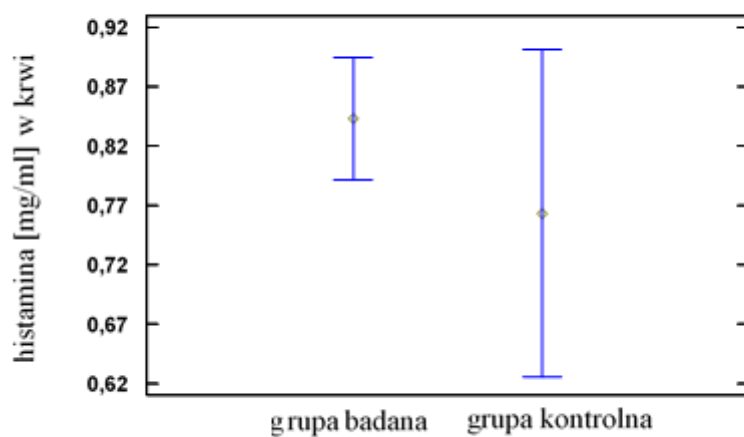
Ryc. 4.5. Średnie i przedziały ufności dla histaminy w endometrium.



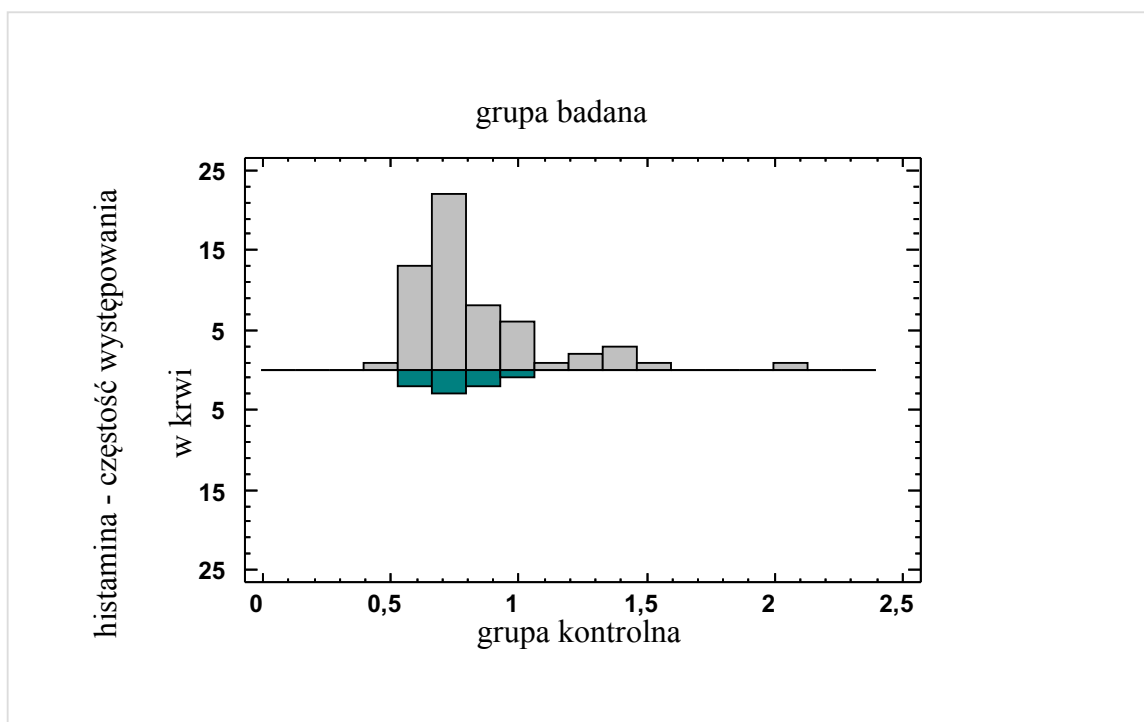
Ryc. 4.6. Częstości obserwowanych wartości histaminy w endometrium.

#### 4.5. Ocena poziomu histaminy we krwi.

Nie wykazano różnicy między poziomem histaminy we krwi kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo (Ryc. 4.7, 4.8).



Ryc. 4.7. Średnie i przedziały ufności dla poziomów histaminy we krwi.



Ryc. 4.8. Częstości obserwowanych wartości histaminy w krwi.

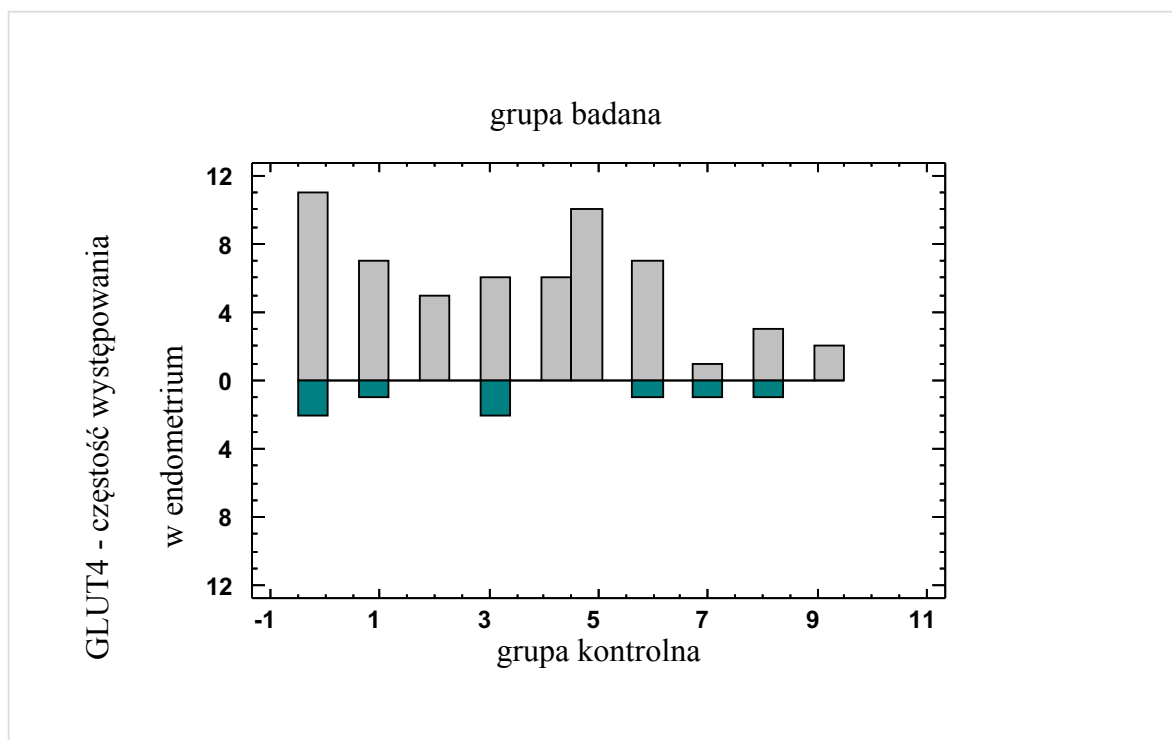
#### 4.6. Analiza korelacji poziomów IL18 i histaminy w endometrium z poziomem we krwi.

Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem IL-18 w endometrium a jej poziomem we krwi. Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem histaminy w endometrium a jej poziomem we krwi.

#### 4.7. Ocena poziomu GLUT4 w endometrium.

Poziom GLUT4 w receptywnym endometrium nie różni się między kobietami z niepłodnością idiopatyczną a posiadającymi potomstwo (Ryc. 4.9).

W tabeli 2. przedstawiono porównanie wartości badanych parametrów w grupie badanej i w grupie kontrolnej.



Ryc. 4.9. Częstości obserwowanych wartości GLUT4 w endometrium.

Tabela 2. Porównanie wartości badanych parametrów w grupie badanej i grupie kontrolnej.

Badany parametr	grupa badana		grupa kontrolna		porównanie	
	średnia	odch. stand.	średnia	odch. stand.	test Manna-Whitneya <sup>U</sup>	test Walda-Wolfowitza
<b>IL-18/mm<sup>2</sup> endometrium</b>	<b>8,79</b>	<b>5,29</b>	<b>18,75</b>	<b>5,01</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,007</b>
IL-18 [pg/ml] krew	126,84	54,10	95,89	18,62	0,188	0,353
Histamina/mm <sup>2</sup> endometrium	10,26	9,48	10,63	5,26	0,269	0,353
Histamina [ng/ml] krew	0,84	0,29	0,76	0,13	0,836	0,353
GLUT4/mm <sup>2</sup> endometrium	3,45	2,62	3,50	3,16	0,984	0,353

## 5. Dyskusja.

Przeprowadzono analizę poziomów trzech wybranych cząsteczek: IL-18 i histaminy jako biorących udział w reakcji zapalnej oraz transportera glukozy GLUT4 w endometrium podczas okna implantacyjnego u 66 kobiet w wieku reprodukcyjnym. Dokonano oceny histopatologicznej pobranych tkanek oraz porównano poziomy tkankowe dwóch ocenianych molekuł, IL-18 oraz histaminy, z ich poziomem we krwi. Przeprowadzona analiza wyników wykazała jedną statystycznie istotną zależność, mianowicie wyższy poziom IL-18 w endometrium w czasie okna implantacyjnego u kobiet posiadających potomstwo niż w grupie kobiet z niepłodnością pierwotną. Ponadto, korelacja między poziomem IL-18 we krwi oraz w endometrium może okazać się istotna statystycznie po przeprowadzeniu stosownych obserwacji na większej grupie pacjentek.

Zastosowana metodyka pozwala na wiarygodną ocenę poziomu badanych molekuł w kontekście powodzenia implantacji, gdyż analizie zostało poddane endometrium w precyzyjnie określonym momencie cyklu – oknie implantacyjnym. Pozwala to na uniknięcie błędu związanego z oceną tkanki nie biorącej udziału w procesie zagnieżdżenia. Kombinacja ultrasonografii z oceną hormonalną zapewnia bardzo dokładne oraz przystępne kosztowo wyznaczenie momentu stosownego do przeprowadzenia analizy. Sama metoda pobrania materiału obarczona jest ryzykiem powikłań oraz stanowi dla pacjentki dyskomfort, niemniej jako jedyna pozwala ocenić warunki panujące w tkance wyścielającej jamę macicy. Niniejsze badanie nie dostarczyło odpowiedzi na pytanie czy istnieje swoisty marker powodzenia implantacji łatwo dostępny diagnostycznie, choć została nakreślona perspektywa dalszych badań w tym kierunku.

Jak wspomniano, dotychczas niewielu autorów badało wymienione cytokiny w endometrium w kontekście płodności. W literaturze dostępna jest jedna publikacja, w której oceniano poziom interleukiny 18 u kobiet z niepłodnością idiopatyczną. Jak wykazano, w odróżnieniu od niniejszego badania, stężenie IL-18 było wyższe u pacjentek z niewyjaśnioną niepłodnością w porównaniu z grupą kontrolną. Do grupy kontrolnej włączono pacjentki ze stwierdzonym czynnikiem jajowodowym lub męską przyczyną niepłodności. Autorzy wykorzystali inną metodę badania aniżeli w niniejszej pracy. U badanych kobiet pobierano popłuczyny z jamy macicy tuż przed pobraniem oocytów w ramach procedury in vitro. Ekspresję IL-18 badano za pomocą testu immunoenzymatycznego. Autorzy postulują, że procedura płukania jamy macicy może optymalizować fizjologiczną początkową pseudozapalną reakcję macicy. Jak zaobserwowano, wskaźniki implantacji były znacznie



wyższe u pacjentek, którzy przeszli płukanie macicy w porównaniu z grupą kontrolną (28). Negatywną rolę IL-18 tłumaczono indukowaniem przez nią IFN-gamma. IL-18 jest syntetyzowana w endometrium jako nieaktywny biologicznie prekursor. Aby przejść w formę aktywną, wymaga konwersji przez enzym IL-1b (kaspaza-1), aktywowany przez proces płukania jamy macicy (62). Różnice w uzyskanych wynikach poziomu IL-18 mogą być spowodowane nie tylko faktem oznaczania cytokiny w innym materiale, ale także doбором grupy kontrolnej. W badaniu będącym podstawą rozprawy punkt odniesienia stanowiły zdrowe kobiety, zdolne do naturalnej koncepcji. Autorzy porównywanego doniesienia w grupie kontrolnej uwzględnili między innymi pacjentki ze stwierdzonym czynnikiem jajowodowym jako przyczyną niepłodności. Niedrożność jajowodów może być spowodowana przebytych bądź obecnym stanem zapalnym w obrębie miednicy mniejszej będącym następstwem infekcji lub endometriozy. Także obecność wodniaków jajowodów może powodować ich niedrożność. Wszystkie te stany są związane z zaburzeniem równowagi w układzie mediatorów stanu zapalnego, co może stanowić czynnik zakłócający i wpływać na wynik badania (5). Z kolei autorzy innego badania analizowali profil cytokin w płynie z jamy macicy pobranym tuż przed transferem zarodka w ramach procedury IVF. Nie wykazano związku między poziomem IL-18 a wskaźnikiem powodzenia IVF mierzonym ilością uzyskanych ciąż (63). Należy pamiętać, że procedury rozrodu wspomaganego są nieodłącznie związane ze znaczną ingerencją w układ hormonalny, co ma bezpośredni wpływ na środowisko w jamie macicy i może być czynnikiem zakłócającym w tym przypadku. Badanie popłuczyn z jamy macicy jest niewątpliwie korzystną z punktu widzenia pacjentki alternatywą badania warunków panujących w jamie macicy. Choć wiąże się z dyskomfortem, nie naraża na ból przy pobieraniu materiału ani na ryzyko powikłań związanych z wykonywaniem biopsji. Nie jest to jednak w pełni reprezentatywny materiał w kontekście oceny warunków implantacji.

Miarodajna ocena poziomu IL-18 w receptywnym endometrium i roli tej molekuly w implantacji powinna następować w kontekście znajomości jej poziomu w macicy w cyklu miesięczkowym. Zbadano ekspresję IL-18, receptora IL-18 (IL-18R) oraz białka wiążącego IL-18 (IL-18BP) - cząsteczki neutralizującej aktywność IL-18. Wykazano, że mRNA IL-18, IL-18R i IL-18BP ulegały konstytutywnej ekspresji bez znaczących wahań w cyklu menstruacyjnym. Zaobserwowano natomiast różnice wskazujące na wzajemne oddziaływanie komórek zrębu endometrium na komórki nabłonkowe. Gdy komórki hodowano osobno, poziomy ekspresji mRNA dla IL-18 w komórkach nabłonkowych były około 18-krotnie wyższe w porównaniu z komórkami zrębu. Ponadto, białko prekursorowe

IL-18 zostało wykryte w hodowanych komórkach nabłonkowych, ale nie w komórkach zrębu. IL-18 stymuluje wydzielanie IFN-gamma przez komórki pochodzące ze szpiku kostnego w endometrium. W mechanizmie sprzężenia zwrotnego IFN- $\gamma$  stymuluje ekspresję IL-18BP zarówno w hodowanych komórkach nabłonkowych, jak i komórkach zrębu. W świetle ról immunomodulujących w różnych tkankach, układ ten może zapewniać ochronę przed patogennymi mikroorganizmami i regulować inwazję trofoblastu poprzez modulowanie lokalnej sieci cytokin (64).

Ciekawych obserwacji dostarczyło badanie ekspresji IL-18 w endometrium kobiet z zespołem policystycznych jajników (*polycystic ovary syndrome*, PCOS). U pacjentek tych wskaźnik implantacji jest niski, zaś wskaźnik utraty ciąży wysoki. Próbkę endometrium uzyskano podczas operacji histeroskopowej. Zaobserwowano znacznie zwiększony poziom IL-18 w endometrium u kobiet z PCOS w porównaniu z pozostałymi grupami. U kobiet z nadwagą ekspresja IL-18 była wyraźnie wyższa w grupie PCOS w porównaniu do grupy zdrowej. Jednak u kobiet o prawidłowej masie ciała nie było statystycznie istotnej różnicy między obiema grupami. Jak skonkludowano, jest to wyrazem przewlekłego zapalenia w endometrium u pacjentów z PCOS (65). Do badania będącym podstawą rozprawy kwalifikowano pacjentki ogólnie zdrowe, bez zaburzeń hormonalnych i metabolicznych, o prawidłowej masie ciała. Odmienne wyniki mogą być efektem wpływu innych niż zapalne czynników (hormonalnych, metabolicznych) na wzrost poziomu IL-18 u pacjentek z PCOS.

IL-18 była badana w różnych aspektach płodności. Przeanalizowano pod kątem obecności IL18 i IL18BP skład płynu pęcherzykowego oocytów. Znany jest bowiem jego związek z jakością oocytów, zapłodnieniem i jakością zarodka. Badania na modelu mysim sugerowały korzystny wpływ tej cytokiny na folikulogenezę (66), zaś podniesione poziomy IL18 dokumentowano w płynie otrzewnowym u pacjentek z zespołem hiperstymulacji jajników, jednym z jatrogennym powikłań procedur rozrodu wspomaganego (67). Przebadano kobiety z niepłodnością pochodzenia jajowodowego poddane zapłodnieniu *in vitro* oraz związek między poziomem cytokin i rezultatem procedury IVF. W badaniu tym nie stwierdzono istotnej korelacji między stężeniami IL-18 i IL18BP a wiekiem pacjentek, liczbą uzyskanych ciąży biochemicznych i liczbą ciąży klinicznych (68). Z kolei autorzy innego badania wykazali, że wyższe stężenie pęcherzykowej IL-18 korelowało dodatnio z szansą na udaną ciążę, podczas gdy niższe poziomy IL-18 stwierdzono u kobiet z idiopatyczną niepłodnością (69). Różnice w wynikach mogły wynikać z mniej heterogenicznej grupy badanej w drugim przypadku, różnic w sposobie oznaczenia IL18 oraz różnych protokołów stymulacji. Wykazano bowiem, iż w cyklach spontanicznych wartości IL-18 w

płynie pęcherzykowym są niższe niż podczas stymulacji owulacji. Nie można wykluczyć prawdopodobieństwa, że rodzaj stymulacji jajników wpływa i modyfikuje syntezę cytokin w płynie pęcherzykowym, w tym IL-18 (70). W związku ze sprzecznymi doniesieniami, trudno uważać, aby poziom IL18 i IL18BP mierzony w płynie pęcherzykowym był markerem prognostycznym powodzenia IVF.

Wpływ IL-18 na płodność zbadano także w odniesieniu do czynnika męskiego. Uważa się, że płyn nasienny jest kluczowym czynnikiem wpływającym na ekspansję regulacyjnych limfocytów T (Treg) w żeńskich drogach rodnych podczas implantacji zarodka. Stwierdzono, że nasienny TGF-beta1 jest odpowiedzialny za lokalną akumulację Treg, niezbędnych dla zapewnienia tolerancji immunologicznej zarodka przez organizm kobiety, podczas gdy nasienna IL-18 zakłóca reakcje komórkowe zależne od TGF-beta1. (71). Interleukina 18 wywołuje także kaskadę prozapalnych cytokin bez udziału czynnika wywołującego (72), co może znacznie osłabić działanie TGF-beta1. IL-18 może więc niekorzystnie wpływać na implantację poprzez wpływ na mechanizmy immunologiczne.

Uzyskane wyniki własne w kontekście doniesień z literatury pozwalają stwierdzić, że IL-18 jest cytokiną o działaniu dwukierunkowym. Z jednej strony jest niezbędna do implantacji w endometrium, prawidłowej inwazji trofoblastu oraz angiogenezy, z drugiej zaś podwyższone stężenie tej cytokiny jest szkodliwe i może potencjalnie prowadzić do niepowodzenia implantacji (73). Potrzebne są dalsze badania, aby możliwe było ustalenie punktu odcięcia dla tej wartości.

Pomimo powszechności występowania histaminy w organizmie, stosunkowo niewielu badaczy sprawdzało jej obecność i rolę w tkankach w kontekście płodności. Jednym z pierwszych opracowań pośrednio związanych z tą tematyką, była analiza metabolizmu histaminy w cyklu miesięczkowym. Zbadano wydalanie histaminy i jej metabolitów - metylohistaminy (MeHi) i kwasu metyloimidazooctowego (MeImAA) w moczu podczas cyklu miesięczkowego kobiet zdrowych, kobiety z alergią i nieciążarnych kobiet z regularnymi cyklami bezowulacyjnymi. Zdrowe kobiety wykazywały niewielkie, indywidualne różnice w wydalaniu histaminy, MeHi i MeImAA. Widoczny był wzrost wydalania metabolitów histaminy w połowie cyklu, co w sposób istotny korelowało z poziomem MeHi i estrogenów w moczu. Wyniki te mogą potwierdzać ustalenia dotyczące stymulacji uwalniania histaminy przez estrogeny w tkance macicy, zaobserwowane na modelu mysim. Zastrzyki z estradiolu u samic myszy powodują stopniowy i długotrwały wzrost wydalania histaminy z moczem (74). Wykazano także wzrost metabolizmu histaminy w związku z owulacją. U kobiety z alergią wydalanie histaminy i jej metabolitów było na

stale zwiększonym poziomie, szczególnie gdy objawy alergiczne nasilały się przed menstruacją. Kobiety z bezowulacyjnymi cyklami miesięczkowymi miały niskie wartości histaminy i metabolitów, niemniej mieszczące się w granicach norm (75).

W przypadku histaminy również badano jej obecność w płynie pęcherzykowym. Stwierdzono znacznie podwyższone stężenie histaminy w płynie pęcherzykowym u kobiet ze stwierdzonymi zrostami w obrębie miednicy mniejszej w porównaniu z płynem pęcherzykowym otrzymanym od kobiet bez zrostów. Zrosty w obrębie miednicy mniejszej mogą tworzyć się na skutek infekcji, endometriozy bądź interwencji chirurgicznych. Ich wspólnym mianownikiem jest stan zapalny, a jak wiadomo, histamina pozostaje jednym z głównych mediatorów stanu zapalnego. Wzrost poziomu histaminy może prowadzić do przedwczesnej owulacji podczas prawidłowego cyklu, co prowadzi do uwolnienia niedojrzałego oocytu. Prawdopodobnie przyczynia się to do obniżenia płodności u kobiet z endometriozą miednicy mniejszej, ale z drożnymi jajowodami, oraz u kobiet, u których operacyjnie przywrócono drożność jajowodów (76). Histamina bierze udział w procesie owulacji. Jej stężenie w jajnikach koreluje z rozszerzeniem naczyń włosowatych pęcherzyków jajnikowych i zwiększoną przepuszczalnością ich ścian. Na modelu zwierzęcym zaobserwowano degranulację komórek tucznych w momencie owulacji (77). Sama histamina, przy braku gonadotropin, może indukować pękanie pęcherzyków jajników królików, co może być hamowane przez antagonistę receptora H<sub>2</sub>, cymetydynę (78).

Histamina odpowiada za wiele reakcji ogólnych w organizmie, stąd w szerokim użyciu pozostają antagoniści receptora H<sub>2</sub>. Są to leki stosowane w leczeniu chorób żołądkowo-jelitowych, takich jak wrzód i choroba refluksowa przełyku. Stwierdzono, iż jeden z H<sub>2</sub> blokerów, cymetydyna (stosowana w dawkach powyżej 100 mg na dobę), ma niekorzystny wpływ na jakość nasienia, obniżając wszystkie jego parametry. Wpływ ranitydyny i nizatydyny na jakość nasienia pozostał niejednoznaczny, zaś famotydyna nie zmieniła jakości nasienia (79). Autorzy innego badania wykazali, że tranilast, bloker komórek tucznych, poprawia parametry nasienia w ciężkiej oligozoospermii. Zwiększoną ilość komórek tucznych obserwowano bowiem w tkance jąder mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia (80). Podobny efekt zaobserwowano dla ebastyny – długodziałającego antagonisty receptora histaminowego H<sub>1</sub> drugiej generacji, który wiąże się preferencyjnie z obwodowymi receptorami H<sub>1</sub> (81). Konieczne jest zatem zbadanie, czy negatywny wpływ cymetydyny na jakość nasienia jest związany z działaniem zależnym od receptora H<sub>2</sub>.

Nie wykazano różnic w poziomie histaminy w endometrium między kobietami płodnymi a grupą o nieustalonej przyczynie niepłodności. Dalsza analiza regulacji

metabolizmu histaminowego w endometrium zwiększy zrozumienie problemów związanych z niepłodnością i może zaoferować nowe podejście farmakologiczne w celu optymalizacji metod wspomaganego rozrodu.

Nie stwierdzono korelacji między poziomem histaminy w endometrium oraz we krwi. Podobnie w przypadku IL-18. Środowisko jamy macicy cechuje się wysoką autonomią, a warunki w endometrium nie przekładają się na efekty ogólnoustrojowe. Stąd nie zidentyfikowano do tej pory markera receptywności endometrium, którego oznaczenie byłoby jednoznaczne, wiarygodne oraz nie wiązało się z koniecznością przeprowadzania skomplikowanych procedur diagnostycznych. Zaproponowane przez autorów z Francji pobieranie popłuczyn z jamy macicy może stanowić alternatywę dla biopsji endometrium obarczoną nieco mniejszymi potencjalnymi powikłaniami, niemniej wiąże się z podobnym stopniem dyskomfortu dla pacjentki (28). Z drugiej strony, procedura pobierania biopsji nie różni się w aspekcie technicznym od endometrial scratching, czyli wywoływania kontrolowanego urazu endometrium celem poprawy jego receptywności.

Jak wspomniano wcześniej, wykonywanie kontrolowanego urazu endometrium celem poprawy wskaźnika implantacji jest zagadnieniem wysoce kontrowersyjnym z uwagi na sprzeczne wyniki badań. Aktualnie, na mocy najnowszego badania z randomizacją którego wyniki zaprezentowano w 2018r. na konferencji European Society of Human Reproduction and Embrology (ESHRE), nie poleca się jej rutynowego wykonywania. Jak wykazano na grupie ponad 1300 kobiet, endometrial scratching nie zwiększa wskaźnika urodzeń żywych w porównaniu do braku interwencji interwencji wśród kobiet poddawanych in vitro. Nie było dowodów na korzyść z tej procedury u kobiet, u których implantacja nie powiodła się co najmniej dwa razy, ani u kobiet, u których nie udało się to nie więcej niż raz. Autorzy zwracają uwagę na dolegliwości bólowe podczas zabiegu (mediana wyniosła 3,5 w 10-stopniowej skali), oraz możliwość wystąpienia efektów niepożądanych. Nie bez znaczenia pozostają dodatkowe koszty i niedogodności związane z koniecznością odbycia dodatkowej wizyty (50). Z kolei w metaanalizie ośmiu badań obejmujących łącznie 1871 cykli inseminacji domacicznych wykazano, że uszkodzenie śluzówki macicy jest związane z wyższym wskaźnikiem ciąż klinicznych i odsetkiem trwających ciąż w porównaniu z grupą kontrolną. U pacjentek tych nie zaobserwowano większego ryzyka ciąży mnogiej, poronienia ani ciąży pozamacicznej (82). W metaanalizie 14-stu badań z randomizacją, obejmującej 2537 pacjentek, oceniano wpływ scratchingu na wskaźnik żywych porodów i wskaźnik ciąż klinicznych, oraz jakie pacjentki mogą potencjalnie skorzystać na tej procedurze. Ostatecznie skonkludowano, iż nie jest jasne, czy scratching endometrium

zwiększa prawdopodobieństwo zajścia w ciążę u kobiet poddawanych procedurom rozrodu wspomaganego, a jeśli tak, to u kogo. Stwierdzono, że *scratching endometrium* nie powinien być oferowany w codziennej praktyce, dopóki nie zostaną udostępnione wyniki dużych i dobrze zaprojektowanych badań klinicznych z randomizacją (*randomized controlled trials*, RCT) oraz bez indywidualnej analizy sytuacji klinicznej pacjentki (83). Aktualnie w Holandii prowadzone jest kolejne wieloośrodkowe, randomizowane kontrolowane badanie kliniczne. Ma ono na celu zbadanie wpływu *scratchingu endometrium* na liczbę urodzeń żywych u kobiet z niewyjaśnioną niepłodnością i dobrym rokowaniem spontanicznego poczęcia (84).

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) w oficjalnych rekomendacjach wskazuje na potencjalną korzyść jaką mogą odnieść dzięki tej procedurze pacjentki z nawracającymi niepowodzeniami implantacji, zaznacza jednak, iż brak dowodów na jej korzystny wpływ u pacjentek podchodzących do transferu zarodka po raz pierwszy (85). Podobnie, Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) wskazuje na konieczność przeprowadzenia dalszych badań przed wydaniem oficjalnych zaleceń dotyczących *endometrial scratching* (86). Badanie przeprowadzone przez zespół naukowców z Iranu wykazało korzystny wpływ *scratchingu endometrium* na wskaźnik implantacji (87). Autorzy dodatkowo popierają wyniki badań własnych przeprowadzonymi obserwacjami na zwierzętach, gdzie uraz endometrium, skutkujący zwiększonym wydzielaniem histaminy, indukował decydualizację i zwiększał szansę na powodzenie implantacji. Zaobserwowano również, że decydualizacja może być efektem stosowania środków uwalniających histaminę (88,89). Rolę histaminy wydzielanej na skutek zwiększonej ekspresji czynnika zwiększającego wydzielanie histaminy (*histamine-releasing factor*, HRF) udowodniono w patogenezie dolegliwości związanych z endometriozą (90). Wykazano, że zwiększona aktywność transkrypcyjna receptora histaminowego H3 koreluje ze stopniem dojrzałości histopatologicznej raka endometrium, sugerując jego rolę w progresji tego nowotworu (91). Jednak wpływ histaminy na endometrium u ludzi w kontekście prawidłowości implantacji nie był dotychczas szczegółowo badany.

Ocena endometrium w cyklu miesięczkowym pod kątem ekspresji transporterów glukozy 1 i 4, receptora insuliny (insulin receptor, IR) oraz czynnika wzrostu insuliny I i II (*insulin growth factor*, IGF) wykazała ich obecność przez całą długość cyklu. Ekspresja mRNA GLUT4 i IGF-I była istotnie wyższa w fazie folikularnej i zlokalizowana na poziomie komórek nabłonkowych (GLUT4) oraz komórek nabłonkowych i zrębu (IGF-I). Ekspresja mRNA IR, GLUT1 i IGF-II była obecna głównie w fazie wydzielniczej i

zlokalizowana na poziomie zrębu. Odwrotną tendencję do ekspresji mRNA IR i GLUT4 zaobserwowano odpowiednio od fazy pęcherzykowej do lutealnej. IR, transportery glukozy i IGF ulegają zatem znacznej i różnej ekspresji na poziomie endometrium w całym cyklu miesięczkowym, zaś endometrium przechodzi cyklicznie stan przejściowy od stanu podstawowego do stanu insulinooporności (92). GLUT1 i GLUT3 są izoformami transporterów glukozy niezależnymi od insuliny. Zostały zidentyfikowane w komórkach endometrium, ich rolą jest zapewnienie odpowiedniego dopływu glukozy do tkanki w procesie implantacji. GLUT1 jest obecny przede wszystkim w tkance doczesnej i łożyska co sugeruje, że ten transporter glukozy może być ważnym markerem aktywności metabolicznej endometrium w okresie ciąży (44). Ludzkie łożysko reguluje transport cząsteczek matki do płodu. Wiadomo, że transport glukozy w układzie płodowo-łożyskowym odbywa się za pośrednictwem transporterów glukozy, jednak dane na temat ekspresji GLUT podczas implantacji są bardzo ograniczone. Obecność GLUT1 stwierdzono w mikrokosmkach syncytiotrofoblastu, w cytotrofoblaście oraz rdzeniu kosmków, podczas gdy GLUT3 był zlokalizowany w cytotrofoblaście i niektórych komórkach śródbłona płodu. Nie zaobserwowano aktywności GLUT4 w tkankach łożyska i doczesnej (93).

Ekspresja receptorów glukozowych w endometrium jest spójna z faktem, iż tkanka ta charakteryzuje się wysokim obrotem komórkowym, a obecność specyficznych receptorów insuliny sugeruje bezpośrednie działanie insuliny na endometrium. GLUT1 jest przezbłonową glikoproteiną odpowiedzialną za pobieranie i magazynowanie glukozy w endometrium, podczas gdy GLUT4 jest zależnym od insuliny transporterem glukozy, który reguluje szybki wychwyt glukozy (45). Badania *in vitro* wykazały znaczny wzrost wiązania insuliny i ekspresji receptorów insulinowych podczas fazy wydzielniczej, co podkreśla ściśle powiązanie funkcjonalne między maszyną zależną od glukozy a rozwojem endometrium (94). Odwrotny trend w ekspresji GLUT1 i GLUT4 potwierdza istnienie różnych mechanizmów wykorzystania glukozy jako substratu na poziomie komórek endometrium (insulinoniezależny versus insulinozależny). W badaniu dowiedziono, iż wzrost ekspresji IR w endometrium nie był sprzężony z równoległym wzrostem GLUT4. Ponieważ niskie stężenie GLUT4 zwykle przyczynia się do wywołania stanu oporności na insulinę, zarówno na poziomie mięśni szkieletowych, jak i na poziomie adipocytów (45), wysnuto hipotezę, że w fazie wydzielniczej cyklu miesięczkowego stan oporności na insulinę można osiągnąć na poziomie komórek endometrium. Dane dowodzą zdolności żeńskich sterydów płciowych do regulowania wrażliwości tkanek na insulinę i modulowania wewnątrzkomórkowych szlaków obrotu glukozy. W fazie pęcherzykowej wszystkie

mechanizmy związane z insuliną konsekwentnie działają na rzecz proliferacji nabłonka gruczołowego, w fazie lutealnej zaś tkanka endometrium staje się oporna na insulinę. Receptor insulinowy moduluje plejotropowe działanie insuliny. Wzrost IR w połączeniu ze zmniejszeniem ekspresji GLUT4 powoduje względne przesunięcie aktywności insuliny z efektu metabolicznego do proliferacyjnego, działając jako czynnik wzrostu (95).

Negatywne wybarwienie immunologiczne białka GLUT4 w komórkach zrębu zasługuje na uwagę, ponieważ w komórkach zrębu stwierdzono obecność receptorów insulinowych. Tkanka ta jest fizjologicznie zaangażowana we wzrost endometrium. Sugeruje to, że w tkance zrębu endometrium insulina działa jako czynnik wzrostu, podobnie jak nabłonkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF), TNF-alfa, TNF-beta i czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), bez żadnego wpływu na wychwyt glukozy. Odwrotnie, ponieważ dane wykazały, że w komórkach zrębu receptor insuliny i jego ekspresja były najwyższe w czasie fazy lutealnej, można zasugerować, że niska ekspresja GLUT4 w zrębie podczas fazy proliferacyjnej może być spowodowane przez niską ekspresję zrębową receptorów insuliny w tej fazie (96).

W badaniu na myszach przeanalizowano wpływ hormonów płciowych na gospodarkę glukozową. Wykazano, że androgen (5-dihydrotestosteron, 5-DHT) promuje insulinooporność u kobiet, podczas gdy estradiol poprawia wrażliwość na insulinę u samców myszy z ciężką cukrzycą (97). Wzrost poziomu glukozy we krwi był powodowany opornością na insulinę indukowaną przez obniżony pobór glukozy w mięśniach, co jest odzwierciedlone było przez obniżoną ekspresję GLUT4. Obniżenie poziomu androgenów i wzrost poziomu estradiolu u chorych na cukrzycę samców myszy poprawiało wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe, przyczyniając się do zmniejszenia podwyższonego poziomu glukozy we krwi. I odwrotnie, wzrost poziomu androgenów i obniżenie poziomu E2 u samic myszy upośledza pobieranie glukozy i indukuje oporność na insulinę. Stąd sugestia, że kontrola poziomów hormonów (stosunek androgenów do E2) może być korzystna dla zwiększenia wrażliwości na insulinę u pacjentów z hiperglikemią (97). U ludzi zmiany w ekspresji GLUT4 w endometrium podczas cyklu miesięczkowego są indukowane przez progesteron. Wykazano bowiem, że w hodowanych tkankach endometrium ludzka gonadotropina kosmówkowa (*human chorionic gonadotropin*, hCG) i E2 nie miały wpływu na ekspresję GLUT4. Jednak sam progesteron jak i progesteron w połączeniu z E2 zmniejszały ekspresję GLUT4. Nieprawidłowe warunki hormonalne, takie jak PCOS (charakteryzujący się zwiększonym poziomem androgenów), zakłócają normalne wzorce ekspresji GLUT4 w komórkach endometrium. Stwierdzono niski poziom ekspresji GLUT4



u pacjentów z PCOS w porównaniu z pacjentami bez PCOS, ponadto nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji GLUT4 u pacjentów z PCOS podczas cyklu miesięczkowego (98). Inni autorzy wykazali brak statystycznie istotnych różnic w poziomach ekspresji GLUT1 i GLUT4 między pacjentkami z PCOS a pacjentkami zdrowymi, lecz u pacjentek z PCOS GLUT1 i GLUT4 były zlokalizowane głównie w jądrach i cytoplazmie, ale nie w błonie komórkowej, a ich transport do błony był upośledzony (99).

Oprócz sterydów płciowych, przyczyną nieprawidłowej interakcji doczesnej i trofoblastu może być dysfunkcja metaboliczna. Adiponektyna, leptyna i inne hormony tkanki tłuszczowej, głównie związane z otyłością i PCOS, mogą mieć wpływ na interakcje doczesnej i trofoblastu u pacjentek otyłych i cierpiących na PCOS (100). Nadmierna aktywacja szlaków zapalnych może być następstwem zaburzeń reakcji immunologicznych czy inwazji naczyń krwionośnych w interakcjach łożyskowych, prowadząc do zaburzeń wzrastania płodu, stanu przedrzucawkowego czy porodu przedwczesnego. PCOS wiąże się ze stanem przewlekłego zapalenia o niskim stopniu nasilenia, objawiającym się zwiększonym stężeniem w surowicy TNF-alfa, IL-6 i IL-1, cząsteczek adhezyjnych, folistatyny i białka C-reaktywnego. Ponadto w PCOS zaobserwowano wzrost wskaźnika stresu oksydacyjnego aktywowanego przez zapalny czynnik transkrypcyjny NF-kappa B (*nuclear factor kappa B*) (101). Zwiększone miejscowe i układowe szlaki zapalne oraz reaktywne formy tlenu są uważane za główną przyczynę niepłodności i niepowodzeń położniczych u kobiet z endometriozą (102). Endometrioza charakteryzuje się nieprawidłowościami w obrębie ścieżek sygnalizacyjnych mediowanych przez receptory estrogenowe i progesteronowe, co jest związane z opornością na progesteron (103). Zaburzona proliferacja i apoptoza komórek, zwiększony stres oksydacyjny, zwiększone wytwarzanie prostaglandyn PGE2 i PGF2a oraz ekspresja COX-2 ostatecznie wpływają na decydualizację, zmniejszając wrażliwość endometrium, a tym samym wpływając na wyniki ciąży (104,105). Stan zapalny w endometriozie wpływa na interakcje doczesna-trofoblast we wczesnym okresie ciąży, a także interakcje kosmówka - doczesna, które mogą aktywować mechanizmy odpowiedzialne za poród przedwczesny w późniejszym okresie ciąży (104).

Pacjentki z PCOS mogą odnieść korzyść ze stosowania metforminy, która jak udowodniono zwiększa ekspresję GLUT4 w endometrium u pacjentek z PCOS (106). U pacjentek z PCOS, które kontynuowały przyjmowanie metforminy podczas ciąży, rzadziej dochodziło do wczesnej utraty ciąży w porównaniu z pacjentami z PCOS, które zaprzestały przyjmowania leku po stwierdzeniu ciąży (107). Z kolei autorzy innego badania wykazali,

że doustne podawanie kwercetyny przez 30 dni może znacznie zwiększyć ekspresję genu GLUT4 w grupie pacjentek z PCOS poprzez mechanizm niezależny od insuliny, a dzięki aktywacji kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK). Ten mechanizm obserwowano zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i w macicy (108). Dowiedziono także, że kwercetyna zwiększa ekspresję GLUT4 poprzez redukcję przewlekłego stanu zapalnego w macicy oraz jest w stanie zwiększyć ekspresję GLUT4 poprzez zwiększenie ekspresji receptora estrogenowego w macicy (109). Analizowano także ekspresję GLUT4 w endometrium kobiet z PCOS w zależności od masy ciała. Podobne wyniki u szczupłych kobiet z PCOS oraz w grupie kontrolnej pozwoliły wysnuć wniosek, że sam zespół policystycznych jajników nie wpływa na ekspresję GLUT4 w endometrium, zmniejsza ją natomiast otyłość u pacjentek z PCOS (96). Terapie estrogenowe zwiększają częstość występowania nieprawidłowości endometrium, w tym raka. Efektowi temu przeciwdziała jednak jednoczesne podawanie progesteronu. O ile ekspresja GLUT1 jest regulowana w górę osobno zarówno przez estrogen jak i progesteron indywidualnie, to połączenie estrogenu i leczenie progesteronem odwraca ten wzrost. Poziomy GLUT4 są prawdopodobnie podwyższone w odpowiedzi na wszystkie terapie hormonalne (110).

Nieprawidłowe środowisko endometrium przyczynia się do zaburzeń płodności czy niekorzystnych wyników położniczych. Może się manifestować poprzez mechanizmy hormonalne, metaboliczne i zapalne. Bywa związane z mięśniakami macicy, endometriozą, adenomiozą, czy PCOS. Zapoczątkowanie i rozwój ciąży wymagają skoordynowania procesów implantacji zarodka i inwazji trofoblastu w receptywne endometrium matki, a następnie przebudowy tętnic spiralnych w macicy. Proliferacja, migracja i inwazja komórek trofoblastycznych do macicy są niezbędnymi elementami, a niepowodzenie któregośkolwiek z nich z powodu dysfunkcji endometrium może być przyczyną rozwoju powikłań położniczych (111).

Fizjologiczne poziomy reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*, ROS) odgrywają ważną rolę regulacyjną poprzez różne szlaki transdukcji w procesie folikulogenezy, dojrzewania oocytów, cyklu przemian endometrium, luteolizy, implantacji, embriogenezy i ciąży. Trwałe i podwyższone wytwarzanie ROS prowadzi do zakłócenia potencjału redukcyjnego, co z kolei powoduje stres oksydacyjny (*oxidative stress*, OS) (112). Stwierdzono, że stres oksydacyjny, stan charakteryzujący się brakiem równowagi między cząsteczkami prooksydacyjnymi, w tym reaktywnymi formami tlenu i azotu, a także obroną przeciwutleniającą, odgrywa istotną rolę w patogenezie niepłodności zarówno u mężczyzn, jak i kobiet. Negatywny wpływ OS na jakość i funkcje nasienia został dobrze

udokumentowany. U kobiet zaś wpływ OS na komórki jajowe i funkcje rozrodcze pozostaje niejasny. Brak równowagi między prooksydantami i przeciwutleniaczami może prowadzić do wielu chorób takich jak endometrioza, PCOS czy niepłodność idiopatyczna. Powikłania ciąży, takie jak poronienia, nawracające utraty ciąży i stan przedrzucawkowy mogą również rozwinąć się w odpowiedzi na OS. Badania wykazały, że ekstremalne czynniki masy ciała i czynniki związane ze stylem życia, takie jak palenie papierosów, spożywanie alkoholu i używanie narkotyków w celach rekreacyjnych, narażenie na zanieczyszczenia środowiska mogą sprzyjać nadmiernej produkcji wolnych rodników, co także może mieć wpływ na płodność. Jednak dotychczasowe badania przeprowadzono na zwierzętach lub w badaniach *in vitro*, w dużej mierze dają sprzeczne wyniki. Stres oksydacyjny został zidentyfikowany jako ważny czynnik sukcesu procedur rozrodu wspomaganego. Z jednej strony udział reaktywnych form tlenu jest niezbędny dla prawidłowej funkcji plemników, jak fuzja z oocytem, kapacytacja i reakcja akrosomowa. Z drugiej strony, OS wytwarzany przez plemniki może wywoływać uszkodzenie komórki jajowej, zmniejszając prawdopodobieństwo zapłodnienia (112). Potencjalna rola stresu oksydacyjnego została zauważona na różnych etapach procedur wspomaganego rozrodu. Zbadano markery stresu oksydacyjnego w wydzielinach endometrium, w tym dysmutazę ponadtlenkową (*superoxide dismutase*, SOD), aktywność katalazy (*catalase activity*, CAT), peroksydazę lipidową (*lipid peroxidase*, LPO), całkowite grupy tiolowe (*total thiol group*, TTG) i całkowitą moc przeciwutleniającą (*total antioxidant power*, TAP). Stwierdzono, że wyższe poziomy przeciwutleniaczy, takich jak SOD, CAT lub TAP, oraz niższe poziomy markerów stresu oksydacyjnego, takich jak LPO w wydzielinach endometrium były związane z pomyślnym wynikiem IVF (113). Dalsze randomizowane kontrolowane badania kliniczne pozwolą wyjaśnić dokładne mechanizmy, poprzez które OS wpływa na potencjał rozrodczy kobiet, i co za tym idzie ułatwią dalsze badania nad możliwymi korzyściami z wykorzystania antyoksydantów w leczeniu niepłodności.

## 6. Wnioski.

- I. Wyższy poziom interleukiny 18 w endometrium w czasie okna implantacyjnego u kobiet posiadających potomstwo niż w grupie kobiet z niepłodnością pierwotną wskazuje na korzystną rolę tej cytokiny w procesie implantacji.
- II. Nieprawidłowości gospodarki histaminowej nie stoją u podłoża niepłodności idiopatycznej.

- III. Pomiar poziomu histaminy w endometrium nie może służyć jako predyktor powodzenia implantacji.
- IV. Pomiar poziomu IL-18 we krwi nie może służyć jako wykładnik receptywności endometrium ani predyktor powodzenia implantacji. Konieczne są dalsze badania na większej grupie pacjentek celem weryfikacji tego wniosku.
- V. Transport glukozy przez insulinozależny transporter GLUT4 w endometrium nie jest upośledzony u pacjentek z niepłodnością idiopatyczną bez obciążeń hormonalnych i metabolicznych.

## 7. Streszczenie w języku polskim.

Problem niepłodności dotyka około 8 do 12% par w wieku reprodukcyjnym na całym świecie, co odpowiada ponad 186 milionom ludzi. U około 20 % par nie udaje się ustalić czynnika powodującego niepłodność po zastosowaniu rutynowych badań diagnostycznych. Jedną z przyczyn niepłodności idiopatycznej mogą stanowić zaburzenia procesu implantacji. Do zagnieżdżenia może dojść w ściśle określonym momencie cyklu miesięczkowego, kiedy zdolność blastocysty do zagnieżdżenia nakłada się z gotowością do jej przyjęcia przez endometrium, tzw. receptywnością endometrium. Przedział czasowy w którym endometrium wykazuje tę właściwość zwany jest oknem implantacyjnym. U ludzi jest to okres trwający od 3 do 6 dni, przypadający na połowę fazy wydzielniczej. W cyklu miesięczkowym o długości 28 dni szacunkowo trwa od 20. do 24. dnia cyklu – to jest od 6 do 10 dni po pikie hormonu luteinizującego (*luteinizing hormone*, LH). Rozminięcie się w czasie tych dwóch faz skutkuje poronieniem. Nabywanie receptywności przez błonę śluzową macicy jest odzwierciedlone w zmianach komórkowych i ultrastrukturalnych. Procesy są sterowane hormonalnie, przez estrogeny i progesteron pochodzenia jajnikowego. Ponadto znaczenie odgrywają lokalnie produkowane molekuły sygnalizacyjne, takie jak cytokiny, czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne homeoboxu, mediatory lipidowe oddziałujące za pomocą sygnalizacji autokrynnej, parakrynnej i juxtakrynnej. W rozważaniu na temat roli lokalnego stanu zapalnego w kontekście płodności kluczowe jest rozróżnienie pomiędzy ostrym stanem zapalnym a przewlekłym stanem zapalnym o umiarkowanym bądź niskim nasileniu. Postuluje się, że mediatory zapalne, w tym interleukina 18 (IL-18) oraz histamina, zwykle uwalniane podczas naprawy i przebudowy tkanek, są ważnymi mediatorami decydualizacji i implantacji.

Z jednej strony, IL-18 obecna w implantacyjnym endometrium w wysokich stężeniach, zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego i utraty ciąży w odpowiedzi na zapalenie wewnątrzmaciczne. Z drugiej strony zaś jest niezbędna dla prawidłowej implantacji. Pomimo powszechności występowania histaminy w organizmie, stosunkowo niewielu badaczy sprawdzało jej obecność i rolę w tkankach w kontekście płodności. Jest cząsteczką niezbędną w procesie implantacji, a jak do tej pory nie badano jej poziomu w endometrium w kontekście niepłodności idiopatycznej. Odpowiedni wychwyt i metabolizm glukozy są niezbędne do prawidłowego różnicowania endometrium macicy w kierunku stanu receptywnego umożliwiającego implantację zarodka. Prawidłowa decydualizacja komórek endometrium *in vitro* zależy od odpowiednich stężeń glukozy. Najlepiej dotychczas opisanym i najliczniejszym w zrębie endometrium transporterem glukozy jest transporter glukozowy typu 1 (*glucose transporter 1*, GLUT1). GLUT4 jest prawdopodobnie najlepiej zbadanym transporterem ze względu na główną rolę, jaką odgrywa w homeostazie glukozy w całym ciele i patogenezie cukrzycy typu II. Nie ma natomiast danych dotyczących roli GLUT4 w niepłodności o nieustalonej przyczynie.

Endometrial scratching, czyli tak zwany kontrolowany uraz endometrium, to technika proponowana w celu ułatwienia implantacji zarodka i zwiększenia prawdopodobieństwa zajścia w ciążę u kobiet leczonych technikami rozrodu wspomaganego (*assisted reproductive technology*, ART). Postuluje się, że uszkodzenie lub „zadrapanie” endometrium, które powstaje w wyniku biopsji, może ułatwić implantację zarodka przez mechanizmy zapalne i immunologiczne. Ponadto, miejscowe uszkodzenie endometrium w stymulowanych cyklach opóźnia rozwój endometrium z powodu procesu gojenia, a tym samym koryguje asynchronię między etapami endometrium i zarodka.

Postanowiono zbadać, czy poziomy wybranych molekuł prozapalnych – IL-18 oraz histaminy, a także transportera glukozowego GLUT4, różnią się w populacji kobiet z niepłodnością o nieustalonej etiologii w porównaniu z kobietami posiadającymi naturalnie poczęte potomstwo.

Celami pracy są:

- I. Analiza poziomu interleukiny 18 oraz histaminy jako cząsteczek o postulowanej roli w procesie implantacji w receptywnym endometrium u kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii oraz porównanie go do grupy kobiet posiadających naturalnie poczęte potomstwo.

- II. Ocena korelacji poziomów interleukiny 18 i histaminy w receptywnym endometrium oraz we krwi jako próba odnalezienia użytecznego diagnostycznie markera receptywności.
- III. Analiza poziomu GLUT4 w receptywnym endometrium kobiet z niepłodnością pierwotną o nieustalonej etiologii i porównanie go z kobietami posiadającymi naturalnie poczęte potomstwo.

Przeprowadzono badanie prospektywne, przekrojowe. Materiał badawczy stanowiła grupa 58 kobiet ze zdiagnozowaną niepłodnością pierwotną, zaś grupę kontrolną 8 pacjentek posiadających naturalnie poczęte potomstwo. Pacjentki rekrutowano spośród kobiet hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii Ginekologicznej i Ginekologii celem przeprowadzenia diagnostyki hormonalnej, konsultowanych w Poradni Endokrynologii Ginekologicznej oraz diagnozowanych w ramach Programu Kompleksowej Ochrony Zdrowia Prokreacyjnego w okresie od listopada 2017 do marca 2019. Projekt badania uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr 1072.6120.78.2017 z dn. 29. czerwca 2017 r. Środki finansowe pozyskano z dotacji celowej nr K/DSC/00421 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Kryteria włączenia do grupy badanej spełniały pacjentki w wieku reprodukcyjnym (18-40 lat) cierpiące z powodu niepłodności pierwotnej (bezsukcesywnie starające się o ciążę przez ponad rok), miesiączkujące regularnie, nie stosujące terapii hormonalnej.

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej spełniały pacjentki w wieku reprodukcyjnym (18-40 lat) posiadające naturalnie poczęte potomstwo w wieku do trzech lat, miesiączkujące regularnie.

Pacjentki z obu grup zrekrutowane do badania zapraszano na wizytę w okresie okna implantacyjnego. Stosowny moment cyklu był określany na podstawie ultrasonograficznego monitoringu owulacji. W trakcie wizyty, po potwierdzeniu przebytej owulacji, wykonywano biopsję aspiracyjną endometrium. W tym samym dniu od każdej pacjentki pobierano próbkę krwi żyłnej o objętości 5 ml. Następnie w pobranym materiale tkankowym metodą immunohistochemiczną oznaczano poziom IL-18, histaminy oraz GLUT4. We krwi metodą ELISA oznaczano poziom IL-18 oraz histaminy. Zebrane dane przeanalizowano przy użyciu stosownych metod statystycznych z wykorzystaniem programu Statistica StatSoft 13.3.

Wykazano, iż poziom IL-18 jest w sposób istotny statystycznie wyższy u kobiet posiadających potomstwo aniżeli u kobiet obciążonych niepłodnością idiopatyczną. Nie wykazano różnicy między poziomem IL-18 we krwi u kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo. Dla wartości IL-18 we krwi

stwierdzono różnicę, która przy większej liczebności grupy kontrolnej mogłaby być istotna statystycznie z uwagi na zawężenie przedziału ufności. Nie wykazano różnicy między poziomem histaminy w receptywnym endometrium kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo. Nie wykazano różnicy między poziomem histaminy we krwi kobiet z niepłodnością idiopatyczną w porównaniu z kobietami posiadającymi potomstwo. Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem IL-18 w endometrium a jej poziomem we krwi. Nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem histaminy w endometrium a jej poziomem we krwi. Stwierdzono, że poziom GLUT4 w receptywnym endometrium nie różni się między kobietami z niepłodnością idiopatyczną a posiadającymi potomstwo.

Uzyskane wyniki własne w kontekście doniesień z literatury pozwalają stwierdzić, że IL-18 jest cytokiną o działaniu dwukierunkowym. Z jednej strony jest niezbędna do implantacji w endometrium, prawidłowej inwazji trofoblastu oraz angiogenezy, z drugiej zaś podwyższone stężenie tej cytokiny jest szkodliwe i może potencjalnie prowadzić do niepowodzenia implantacji. Potrzebne są dalsze badania, aby możliwe było ustalenie punktu odcięcia dla tej wartości. Nie wykazano różnic w poziomie histaminy w endometrium między kobietami płodnymi a grupą o nieustalonej przyczynie niepłodności. Znajomość regulacji metabolizmu histaminowego w endometrium zwiększy zrozumienie problemów związanych z niepłodnością i może zaoferować nowe podejście farmakologiczne w celu optymalizacji metod wspomaganego rozrodu. Nie stwierdzono korelacji między poziomem histaminy w endometrium oraz we krwi. Podobnie w przypadku IL-18. Środowisko jamy macicy cechuje się wysoką autonomią, a warunki w endometrium nie przekładają się na efekty ogólnoustrojowe. Stąd nie zidentyfikowano do tej pory markera receptywności endometrium, którego oznaczenie byłoby jednoznaczne, wiarygodne oraz nie wiązało się z koniecznością przeprowadzania skomplikowanych procedur diagnostycznych. Wykonywanie kontrolowanego urazu endometrium celem poprawy wskaźnika implantacji jest zagadnieniem wysoce kontrowersyjnym z uwagi na sprzeczne wyniki badań. Ekspresja receptorów glukozowych w endometrium jest spójna z faktem, iż tkanka ta charakteryzuje się wysokim obrotem komórkowym, a obecność specyficznych receptorów insuliny sugeruje bezpośrednie działanie insuliny na endometrium. Nieprawidłowe warunki hormonalne, takie jak PCOS (charakteryzujący się zwiększonym poziomem androgenów), zakłócają normalne wzorce ekspresji GLUT4 w komórkach endometrium.

## 8. Summary in english.

The problem of infertility affects around 8 to 12% of reproductive age couples worldwide, which corresponds to more than 186 million people. Approximately 20% of couples cannot be diagnosed with particular factor causing infertility after routine diagnostic tests. Implantation disorders may be one of the causes of idiopathic infertility. Implantation can occur only at a specific point in the menstrual cycle, when the blastocyst's ability to implant is superimposed with readiness to be accepted by the endometrium, the so-called endometrial receptivity. The time interval in which the endometrium manifests this feature is called the implantation window. In human, this is a period of 3 to 6 days, falling in half of the secretory phase. In a 28-day menstrual cycle, it is estimated to last from the 20th to the 24th day of the cycle - that is, 6 to 10 days after the luteinizing hormone (LH) peak. Misadaptation of these two phases results in a miscarriage. Acquisition of receptivity by the endometrium is reflected in cellular and ultrastructural changes. These processes are controlled hormonally by estrogen and ovarian progesterone. In addition, locally produced signaling molecules such as cytokines, growth factors, homeobox transcription factors, and lipid mediators interacting with autocrine, paracrine and juxtacrine signaling play a role. Considering the role of local inflammation in the context of fertility, the distinction between acute inflammation and chronic inflammation of moderate or low intensity is the key. It is postulated that inflammatory mediators, including interleukin 18 (IL-18) and histamine, usually released during tissue repair and remodeling, are important mediators in decidualization and implantation. On the one hand, IL-18 is necessary for proper implantation in endometrium, undisturbed invasion of trophoblast and angiogenesis. On the other hand, in high concentrations IL-18 may potentially lead to implantation failure. Despite the widespread occurrence of histamine in organisms, few researches check its presence and role in tissues in the context of fertility. It is a molecule necessary for the implantation process, however its level in the endometrium in the context of idiopathic infertility has not been studied so far.

There was no correlation between histamine levels in the endometrium and in the blood. Similarly for IL-18. The environment of the uterine cavity is characterized by high autonomy, and conditions in the endometrium do not reflect systemic effects. Therefore, the endometrial receptivity marker has not yet been identified, whose determination would be unambiguous, reliable and did not involve the need for complicated diagnostic procedures. Performing a controlled endometrial injury to improve the implantation rate is a highly



controversial issue due to conflicting research results. Appropriate glucose uptake and metabolism are associated with the function of differentiating the uterine endometrium towards receptive state that allows implantation of the embryo. The correct decidualization depends on adequate glucose concentration. The best described and most abundant glucose transporter in the endometrial stroma is glucose transporter 1 (GLUT1). GLUT4 is the most popular transporter studied due to its major role in glucose homeostasis throughout the body and the pathogenesis of type II diabetes. There is no data concerning role of GLUT4 in infertility of an undetermined cause. Endometrial scratching, or so-called controlled endometrial trauma, is a technique proposed to facilitate embryo implantation and increase the likelihood of pregnancy in women treated with assisted reproductive technology (ART). It is postulated that damage or "scratching" of the endometrium that occurs as a result of biopsy may facilitate implantation of the embryo through inflammatory and immunological mechanisms. In addition, local endometrial damage in stimulated cycles delays endometrial development due to the healing process, and thus corrects asynchrony between the endometrial and embryo stages.

It was decided to examine whether the levels of selected pro-inflammatory molecules – IL-18 and histamine, as well as the GLUT4, differ in the population of women with infertility of unknown etiology as compared to women with naturally conceived offspring.

Work objectives include:

- I. Analysis of the level of IL-18 and histamine as molecules with a postulated role in the process of implantation in the receptive endometrium in women with primary idiopathic infertility in comparison to a group of women with naturally conceived offspring.
- II. Assessment of the correlation of IL-18 and histamine levels in the receptive endometrium and in the blood as an attempt to find a diagnostically useful receptivity marker.
- III. Analysis of GLUT4 level in the receptive endometrium of women with primary idiopathic infertility of unknown etiology in comparison with women with naturally conceived offspring.

A prospective, cross-sectional study was conducted. The research material was a group of 58 women diagnosed with primary idiopathic infertility, and the control group - 8 patients with naturally conceived offspring. Patients were recruited among women hospitalized at the Gynecological Endocrinology and Gynecology Clinic for hormonal diagnostics, consulted at the Gynecological Endocrinology Clinic and diagnosed in

Comprehensive Procreational Health Protection Program from November 2017 to March 2019. The study design received a positive opinion from the Bioethical Committee of the Jagiellonian University No. 1072.6120 .78.2017 on 29th June 2017. Financial resources were obtained from the Ministry of Science and Higher Education grant No. K / DSC / 0042.

The study group inclusion criteria were met by patients in reproductive age (18-40 years) suffering from primary infertility (unsuccessful seeking pregnancy for over a year), menstruating regularly, not using hormonal therapy.

The control group inclusion criteria were met by patients in reproductive age (18-40 years) with naturally conceived offspring up to three years of age, regularly menstruating.

Patients from both groups recruited for the study were invited to the Clinic during the implantation period. The appropriate moment of the cycle was determined on the basis of ultrasound ovulation monitoring. During the visit, after confirmation of ovulation, an endometrial aspiration biopsy was performed. On the same day, a 5 ml venous blood sample was taken from each patient. Then, IL-18, histamine and GLUT4 levels were checked in the collected tissue material by immunohistochemistry. Blood levels of IL-18 and histamine were determined by ELISA. The collected data was analyzed using appropriate statistical methods using the Statistica StatSoft 13.3 program.

It has been shown that the level of IL-18 is statistically significantly higher in women with offspring than in women with idiopathic infertility. There was no difference between blood IL-18 levels in women with idiopathic infertility compared to women with offspring. For the IL-18 value in the blood, a difference was found which, if the control group was larger, could be statistically significant due to the narrowing of the confidence interval. There was no difference between the histamine level in the receptive endometrium of women with idiopathic infertility compared with women with offspring. There was no difference between the levels of histamine in the blood of women with idiopathic infertility compared with women with offspring. There was no correlation between the level of IL-18 in the endometrium and its level in the blood. There was no correlation between the level of histamine in the endometrium and its level in the blood. It was found that GLUT4 levels in the receptive endometrium do not differ between women with idiopathic infertility and those with offspring.

Obtained own results in the context of reports from the literature allow to state that IL-18 is a bi-directional cytokine. On the one hand, it is necessary for implantation in the endometrium, proper trophoblast invasion and angiogenesis, on the other, the elevated concentration of this cytokine is harmful and can potentially lead to implantation failure.

More research is needed to determine the cut-off point for this value. There were no differences in the level of histamine in the endometrium between fertile women and the group of undetermined cause of infertility. Knowledge of the regulation of histamine metabolism in the endometrium will increase understanding of infertility problems and may offer a new pharmacological approach to optimize assisted reproduction methods. There was no correlation between histamine levels in the endometrium and in the blood. Similarly for IL-18. The environment of the uterine cavity is characterized by high autonomy, and conditions in the endometrium do not translate into systemic effects. Therefore, the endometrial receptivity marker has not yet been identified, whose determination would be unambiguous, reliable and did not involve the need for complicated diagnostic procedures. Performing a controlled endometrial injury to improve the implantation rate is a highly controversial issue due to conflicting research results. The expression of glucose receptors in the endometrium is consistent with the fact that this tissue is characterized by high cell turnover, and the presence of specific insulin receptors suggests a direct effect of insulin on the endometrium. Abnormal hormonal conditions, such as PCOS (characterized by increased levels of androgens), interfere with normal GLUT4 expression patterns in endometrial cells.

## 9. Piśmiennictwo.

1. Vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62(February):2–10.
2. Psigo O. Diagnostyka i leczenie niepłodności — rekomendacje Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii ( PTMRiE ) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników ( PTGP ) Diagnostics and infertility treatment – recommendations of the Polish Society. 2018;(3):112–40.
3. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 2005;20(5):1144–7.
4. Malina A, Błaszczewicz A, Owczarz U. Psychosocial aspects of infertility and its treatment. *Ginekol Pol.* 2016;87(7):527–31.
5. Abrao MS, Muzii L, Marana R. Anatomical causes of female infertility and their management. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2013;123(SUPPL. 2):S18–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.09.008>
6. Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med.* 2016;38(4):979–86.
7. Shimomura H, Dangott LJ, Garbers DL. Covalent coupling of a resact analogue to guanylate cyclase. *J Biol Chem.* 1986;261(33):15778–82.
8. Lishko P V., Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu Rev Physiol.* 2012;74(1):453–75.
9. Satouh Y, Ikawa M. New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2018;43(10):818–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.006>
10. Jean C, Haghighirad F, Zhu Y, Chalbi M, Ziyat A, Rubinstein E, et al. JUNO, the receptor of sperm IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilisation. *Hum Reprod.* 2019;34(1):118–26.

11. Krauchunas AR, Wolfner MF. Molecular Changes During Egg Activation [Internet]. 1st ed. Vol. 102, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc.; 2013. 267–292 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00010-6>
12. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. Nat Med [Internet]. 2012;18(12):1754–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3012>
13. Wang H, Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. Mol Aspects Med [Internet]. 2013;34(5):939–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.011>
14. Lessey BA, Young SL. What exactly is endometrial receptivity? Fertil Steril [Internet]. 2019;111(4):611–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.02.009>
15. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: A prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. Fertil Steril [Internet]. 2011;96(2):344–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.050>
16. Prevention PD. Rekomendacje Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące zastosowania progesteronu w profilaktyce porodu przedwczesnego Polish Gynaecologic Society Guidelines for Progesteron Use in. 2009;147–9.
17. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Amarouchi K, Teklenburg G, Gutknecht D, et al. Cytokine profiling in endometrial secretions: A non-invasive window on endometrial receptivity. Reprod Biomed Online [Internet]. 2009;18(1):85–94. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60429-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60429-4)
18. Lédée N, Dubanchet S, Oger P, Meynant C, Lombroso R, Ville Y, et al. Uterine receptivity and cytokines: New concepts and new applications. Gynecol Obstet Invest. 2007;64(3):138–43.
19. Libby P. ManagedHealthcareExecutive.com. Nutr Rev. 2007;2007(December).

20. Stewart AG, Beart PM. Inflammation: Maladies, models, mechanisms and molecules. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):631–4.
21. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2014;1843(11):2563–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
22. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2 SUPPL. 2):S3–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
23. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):984–1010.
24. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1803:57–79.
25. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
26. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14(7):353–6.
27. Ostojic S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truyens C, Capron F. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2003;49(2):101–12.
28. Lédée-Bataille N, Olivennes F, Kadoch J, Dubanchet S, Frydman N, Chaouat G, et al. Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer. *Hum Reprod*. 2004;19(9):1968–73.
29. Smeltz RB, Chen J, Hu-Li J, Shevach EM. Regulation of interleukin (IL)-18 receptor  $\alpha$  chain expression on CD4<sup>+</sup> T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation: Critical downregulatory role of IL-4. *J Exp Med*. 2001;194(2):143–53.

30. Greaves MW, Sabroe RA. Histamine: The quintessential mediator. *J Dermatol*. 1996;23(11):735–40.
31. Lieberman P. The basics of histamine biology. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. 2011;106(2 SUPPL.):S2–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2010.08.005>
32. Noskova V, Bottalico B, Olsson H, Ehinger A, Pilka R, Casslén B, et al. Histamine uptake by human endometrial cells expressing the organic cation transporter EMT and the vesicular monoamine transporter-2. 2006;12(8):483–9.
33. Rockwell LC, Pillai S, Olson CE, Koos RD. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Action Blocks Estrogen-Induced Uterine Edema and Implantation in Rodents1. *Biol Reprod*. 2002;67(6):1804–10.
34. Dey SK. Role of Histamine in Implantation: Inhibition of Histidine Decarboxylase Induces Delayed Implantation in the Rabbit. *Biol Reprod*. 1981;24(4):867–9.
35. Wv W, Kitamura Y, Maeyama K. in Uterus histamine. 1982;25–8.
36. Casslén B, Lund R. BERTIL CASSLÉN, JOHANNA NORDENGREN, MEF NILBERT,. 2015;80(9):2776–84.
37. Liu Z, Kilburn BA, Leach RE, Romero R, Paria BC. Histamine Enhances Cytotrophoblast Invasion by Inducing Intracellular Calcium Transients Through the Histamine Type-1 Receptor. 2004;353(January):345–53.
38. Brandon JM, Raval PJ. Interaction of estrogen and histamine during ovum implantation in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1979;57(2–3):171–7.
39. Velicky P, Windsperger K, Petroczi K, Pils S, Reiter B, Weiss T, et al. Pregnancy-associated diamine oxidase originates from extravillous trophoblasts and is decreased in early-onset preeclampsia. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
40. Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, Ven K Van Der, Novak N. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy : a critical review. 2008;14(5):485–95.
41. Frolova AI, Moley KH. Glucose transporters in the uterus: An analysis of tissue

distribution and proposed physiological roles. *Reproduction*. 2011;142(2):211–20.

42. Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Arici A. Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta*. 2002;23(8–9):672–84.
43. Frolova AI, Moley KH. Quantitative analysis of glucose transporter mRNAs in endometrial stromal cells reveals critical role of GLUT1 in uterine receptivity. *Endocrinology*. 2011;152(5):2123–8.
44. Von Wolff M, Ursel S, Hahn U, Steldinger R, Strowitzki T. Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium: Expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(8):3885–92.
45. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2010;298(2):141–5.
46. Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and aberrant function. *J Parenter Enter Nutr*. 2004;28(5):364–71.
47. Welch RD, Gorski J. Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus. *Endocrinology*. 1999;140(8):3602–8.
48. Türkay Korgun E, Demir R, Hammer A, Dohr G, Desoye G, Skofitsch G, et al. Glucose Transporter Expression in Rat Embryo and Uterus During Decidualization, Implantation, and Early Postimplantation1. *Biol Reprod*. 2001;65(5):1364–70.
49. Kohan K, Carvajal R, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M. Role of the transcriptional factors FOXO1 and PPARG on gene expression of SLC2A4 in endometrial tissue from women with polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2010;140(1):123–31.
50. Lensen S, Osavlyuk D, Armstrong S, Stadelmann C, Hennes A, Napier E, et al. A Randomized trial of endometrial scratching before in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2019;380(4):325–34.



51. Gnainsky Y, Granot I, Aldo P, Barash A, Or Y, Mor G, et al. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: The mechanism of action. *Reproduction*. 2015;149(1):75–85.
52. Nastri CO, Lensen SF, Gibreel A, Raine-Fenning N, Ferriani RA, Bhattacharya S, et al. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(3).
53. Li R, Hao G. Local injury to the endometrium: Its effect on implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21(3):236–9.
54. Lass A, Peat D, Avery S, Brinsden P. Histological evaluation of endometrium on the day of oocyte retrieval after gonadotrophin-releasing hormone agonist/follicle stimulating hormone ovulation induction for in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998;13(11):3203–5.
55. Almog B, Shalom-Paz E, Dufort D, Tulandi T. Promoting implantation by local injury to the endometrium. *Fertil Steril* [Internet]. 2010;94(6):2026–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.075>
56. Potdar N, Gelbaya T, Nardo LG. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2012;25(6):561–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.08.005>
57. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, Barash A, Or Y, Schechtman E, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril* [Internet]. 2010;94(6):2030–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.02.022>
58. Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2006;13(1):13–23. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62011-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62011-1)
59. Junovich G, Mayer Y, Azpiroz A, Daher S, Iglesias A, Zylverstein C, et al. Ovarian Stimulation Affects the Levels of Regulatory Endometrial NK Cells and Angiogenic Cytokine VEGF. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(2):146–53.

60. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC, Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2010;87(1–2):60–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.07.001>
61. Bulmer JN, Lash GE. Uterine natural killer cells: Time for a re-appraisal? *F1000Research*. 2019;8:1–11.
62. Oger P, Bulla R, Tedesco F, Portier A, Dubanchet S, Bailly M, et al. Higher interleukin-18 and mannose-binding lectin are present in uterine lumen of patients with unexplained infertility. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2009;19(4):591–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.05.011>
63. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Lentjes EG, Fauser BCJM, Heijnen CJ, et al. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod*. 2009;24(6):1427–35.
64. Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Yano T, Fujii T, et al. Evidence for the expression of interleukin (IL)-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(7):649–54.
65. Long X, Li R, Yang Y, Qiao J. Overexpression of IL-18 in the Proliferative Phase Endometrium of Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci*. 2017;24(2):252–7.
66. Tsuji Y, Tamaoki TH, Hasegawa A, Kashiwamura SI, Iemoto A, Ueda H, et al. Expression of interleukin-18 and its receptor in mouse ovary. *Am J Reprod Immunol*. 2001;46(5):349–57.
67. Barak V, Elchalal U, Edelstein M, Kalickman I, Lewin A, Abramov Y. Interleukin-18 levels correlate with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2004;82(2):415–20.
68. Radwan P, Radwan M, Połać I, Lewkowicz P, Wilczyński JR. IL-18 and IL-18 binding protein concentration in ovarian follicular fluid of women with “tubal factor” subjected to in vitro fertilization. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013;67:463–70.
69. Sarapik A, Velthut A, Haller-Kikkatalo K, Faure GC, Béné MC, De Carvalho Bittencourt

M, et al. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. Clin Dev Immunol. 2012;2012.

70. Vujisić S, Lepej SŽ, Emedi I, Bauman R, Remenar A, Tiljak MK. Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23. Hum Reprod. 2006;21(10):2650–5.
71. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. Front Immunol. 2013;4(OCT):1–11.
72. Puren AJ, Su MS, Dinarello CA. IL-18 induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14 + human blood mononuclear cells. J Clin Invest. 1998;101(3):711–21.
73. Lédée-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. Fertil Steril. 2005;83(3):598–605.
74. Andersson AC, Henningsson S, Rosengren E. Increased formation of diamines and polyamines in the pregnant rat. J Physiol. 1978;285(1):311–24.
75. Jonassen F, Granerus G, Wetterqvist H. Histamine Metabolism During the Menstrual Cycle. Acta Obstet Gynecol Scand. 1976;55(4):297–304.
76. Shrivastav P, Gill DS, Jeremy JY, Craft I, Dandona P. Follicular Fluid Histamine Concentrations In Infertile Women With Pelvic Adhesions. Acta Obstet Gynecol Scand. 1988;67(8):727–9.
77. Krishna A, Terranova PF. Alterations in Mast Cell Degranulation and Ovarian Histamine in the Proestrous Hamster 1. Biol Reprod. 1985;32(5):1211–7.
78. Kobayashi Y, Wright KH, Santulli R, Wallach EE. The effect of histamine and histamine blockers on the ovulatory process in the in vitro perfused rabbit ovary. Fertil Steril. 1982;37(Suppl. 2):297–8.
79. Banihani SA. Histamine-2 Receptor Antagonists and Semen Quality. Basic Clin

Pharmacol Toxicol. 2016;118(1):9–13.

80. Hibi H, Kato K, Mitsui K, Taki T, Yamada Y, Honda N, et al. The treatment with tranilast, a mast cell blocker, for idiopathic oligozoospermia. *Arch Androl.* 2001;47(2):107–11.
81. Matsuki S, Sasagawa I, Suzuki Y, Yazawa H, Tateno T, Hashimoto T, et al. The use of ebastine, a mast cell blocker, for treatment of oligozoospermia. *Arch Androl.* 2000;44(2):129–32.
82. Vitagliano A, Noventa M, Saccone G, Gizzo S, Vitale SG, Laganà AS, et al. Endometrial scratch injury before intrauterine insemination: is it time to re-evaluate its value? Evidence from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 2018;109(1):84-96.e4.
83. van Hoogenhuijze NE, Kasius JC, Broekmans FJM, Bosteels J, Torrance HL. Endometrial scratching prior to IVF; does it help and for whom? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open.* 2019;2019(1):1–18.
84. Bui BN, Torrance HL, Janssen C, Cohlen B, De Bruin JP, Den Hartog JE, et al. Does endometrial scratching increase the rate of spontaneous conception in couples with unexplained infertility and a good prognosis (Hunault > 30%)? Study protocol of the SCRaTCH-OFO trial: A randomized controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018;18(1):1–9.
85. Impact S, No P. Local Endometrial Trauma ( Endometrial Scratch ): A Treatment Strategy to Improve Implantation Rates. 2016;(54).
86. Treatment add-ons | Human Fertilisation and Embryology Authority [Internet]. [cited 2020 Feb 2]. Available from: <https://www.hfea.gov.uk/treatments/explore-all-treatments/treatment-add-ons/>
87. Karimzadeh MA, Rozbahani MA, Tabibnejad N. Endometrial local injury improves the pregnancy rate among recurrent implantation failure patients undergoing in vitro fertilisation/intra cytoplasmic sperm injection : A randomised clinical trial. 2009;677–80.
88. Finn CA, Martin L. Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus. *Biol Reprod.* 1972;7(1):82–6.

89. By KW. INTERACTIONS BETWEEN OESTRADIOL 3 , 17 $\beta$  AND PROGESTERONE ON THE INDUCTION AND GROWTH OF DECIDUOMATA IN OVARECTOMIZED MICE. 2006;(Blandau 1949):689–700.
90. Oikawa K, Kosugi Y, Ohbayashi T, Kameta A, Isaka K, Takayama M, et al. Increased expression of IgE-dependent histamine-releasing factor in endometriotic implants. 2003;(January):318–23.
91. Pol G. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A u kobiet z gruczolakorakiem endometrium Expression profile of genes associated with the histaminergic system. 2014;(3):172–9.
92. Mioni R, Chiarelli S, Xamin N, Zuliani L, Granzotto M, Mozzanega B, et al. Evidence for the presence of glucose transporter 4 in the endometrium and its regulation in polycystic ovary syndrome patients. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(8):4089–96.
93. Korgun ET, Celik-Ozenci C, Seval Y, Desoye G, Demir R. Do glucose transporters have other roles in addition to placental glucose transport during early pregnancy? Histochem Cell Biol. 2005;123(6):621–9.
94. Strowitzki T, Von Eye HC, Kellerer M, Haring HU. Tyrosine kinase activity of insulin-like growth factor I and insulin receptors in human endometrium during the menstrual cycle: Cyclic variation of insulin receptor expression. Fertil Steril. 1993;59(2):315–22.
95. Mioni R, Mozzanega B, Granzotto M, Pierobon A, Zuliani L, Maffei P, et al. Insulin receptor and glucose transporters mRNA expression throughout the menstrual cycle in human endometrium: Aphysiological and cyclical condition of tissue insulin resistance. Gynecol Endocrinol. 2012;28(12):1014–8.
96. Mozzanega B, Mioni R, Granzotto M, Chiarelli S, Xamin N, Zuliani L, et al. Obesity reduces the expression of GLUT4 in the endometrium of normoinsulinemic women affected by the polycystic ovary syndrome. Ann N Y Acad Sci. 2004;1034:364–74.
97. Inada A, Fujii NL, Inada O, Higaki Y, Furuichi Y, Nabeshima YI. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and androgen on glucose metabolism in skeletal muscle. Endocrinology.

2016;157(12):4691–705.

98. Cui P, Li X, Wang X, Feng Y, Lin JF, Billig H, et al. Lack of cyclical fluctuations of endometrial GLUT4 expression in women with polycystic ovary syndrome: Evidence for direct regulation of GLUT4 by steroid hormones. *BBA Clin* [Internet]. 2015;4:85–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.08.004>
99. Zhao D, Qu Q, Dai H, Liu Y, Jiang L, Huang X, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  on endometrial receptivity of women with polycystic ovary syndrome. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):414–21.
100. Crujeiras AB, Casanueva FF. Obesity and the reproductive system disorders: Epigenetics as a potential bridge. *Hum Reprod Update*. 2015;21(2):249–61.
101. Palomba S, Falbo A, Chiossi G, Orio F, Tolino A, Colao A, et al. Low-grade chronic inflammation in pregnant women with polycystic ovary syndrome: A prospective controlled clinical study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):2942–51.
102. Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: Hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Updat endometriosis.pdf*. 2013;19(4):406–18.
103. Lessey BA, Young SL. Homeostasis imbalance in the endometrium of women with implantation defects: The role of estrogen and progesterone. *Semin Reprod Med*. 2014;32(5):365–75.
104. Tamaresis JS, Irwin JC, Goldfien GA, Rabban JT, Burney RO, Nezhat C, et al. Molecular classification of endometriosis and disease stage using high-dimensional genomic data. *Endocrinology*. 2014;155(12):4986–99.
105. Vilella F, Ramirez L, Berlanga O, Martínez S, Alamá P, Meseguer M, et al. PGE2 and PGF2 $\alpha$  concentrations in human endometrial fluid as biomarkers for embryonic implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):4123–32.
106. Ferreira GD, Germeyer A, De Barros Machado A, Do Nascimento TL, Strowitzki T, Brum IS, et al. Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and

insulin. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]. 2014;175(1):157–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.01.009>

107. Nawaz FH, Rizvi J. Continuation of metformin reduces early pregnancy loss in obese pakistani women with polycystic ovarian syndrome. Gynecol Obstet Invest. 2010;69(3):184–9.
108. Neisy A, Zal F, Seghatoleslam A, Alaei S. Amelioration by quercetin of insulin resistance and uterine GLUT4 and ER $\alpha$  gene expression in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). Reprod Fertil Dev. 2019;31(2):315–23.
109. Wang Y, Guo T, Zhao S, Li Z, Mao Y, Li H, et al. Expression of the Human Glucokinase Gene: Important Roles of the 5' Flanking and Intron 1 Sequences. PLoS One. 2012;7(9).
110. Medina RA, Meneses AM, Vera JC, Gúzman C, Nualart F, Rodriguez F, et al. Differential regulation of glucose transporter expression by estrogen and progesterone in Ishikawa endometrial cancer cells. J Endocrinol. 2004;182(3):467–78.
111. Vannuccini S, Clifton VL, Fraser IS, Taylor HS, Critchley H, Giudice LC, et al. Infertility and reproductive disorders: Impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. Hum Reprod Update. 2016;22(1):104–15.
112. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. Antioxidants Redox Signal. 2008;10(8):1375–403.
113. Rahiminejad ME, Moaddab A, Ganji M, Eskandari N, Yezpey M, Rabiee S, et al. Oxidative stress biomarkers in endometrial secretions: A comparison between successful and unsuccessful in vitro fertilization cycles. J Reprod Immunol [Internet]. 2016;116:70–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2016.05.003>

## 10. Spis tabel.

Tabela 1. Stopnie rozcieńczenia i czasy inkubacji poszczególnych przeciwciał.....	30
Tabela 2. Porównanie wartości badanych parametrów w grupie badanej i grupie kontrolnej.....	38

## 11. Spis rycin.

Rycina 4.1. Średnie i przedziały ufności dla poziomu IL-18 w endometrium.....	32
Rycina 4.2. Częstości obserwowanych wartości IL-18 w endometrium.....	33
Rycina. 4.3. Średnie i przedziały ufności dla poziomu IL-18 we krwi.....	34
Rycina. 4.4. Częstości obserwowanych wartości IL-18 we krwi.....	34
Rycina. 4.5. Średnie i przedziały ufności dla histaminy w endometrium.....	35
Rycina. 4.6. Częstości obserwowanych wartości histaminy w endometrium.....	36
Rycina. 4.7. Średnie i przedziały ufności dla poziomów histaminy we krwi.....	36
Rycina. 4.8. Częstości obserwowanych wartości histaminy w krwi.....	37
Rycina. 4.9. Częstości obserwowanych wartości GLUT4 w endometrium.....	38